

MARCELA CAETANO LOPES

**EXTRAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO, A PARTIR DE LODO DE ESGOTO, NA
PRODUÇÃO DE ALFACE**

Botucatu

2022

MARCELA CAETANO LOPES

**EXTRAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO, A PARTIR DE LODO DE ESGOTO, NA
PRODUÇÃO DE ALFACE**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da Unesp Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Doutora em
Agronomia (Horticultura).

Orientador: Prof. Dr. Roberto Lyra Villas Boas

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Broetto

Botucatu

2022

L864e

Lopes, Marcela Caetano

Extração de ácido húmico, a partir de lodo de esgoto, na produção de alface / Marcela Caetano Lopes. -- Botucatu, 2022
125 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp),
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Roberto Lyra Villas Boas

Coorientador: Fernando Broetto

1. Substâncias Húmicas. 2. Extração de Ácido Húmico. 3.
Lodo de Esgoto. 4. Alface - Produtividade. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da
Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EXTRAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO, A PARTIR DE LODO DE ESGOTO, NA PRODUÇÃO DE ALFACE

AUTORA: MARCELA CAETANO LOPES

ORIENTADOR: ROBERTO LYRA VILLAS BÔAS

COORIENTADOR: FERNANDO BROETTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em AGRONOMIA (HORTICULTURA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. ROBERTO LYRA VILLAS BÔAS (Participação Virtual)
Ciência Florestal Solos e Ambiente / Faculdade de Ciências Agrômicas de Botucatu UNESP

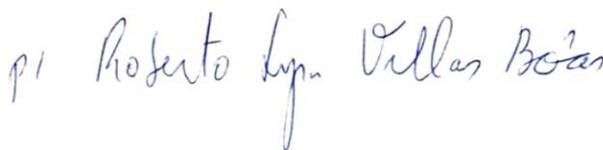
Dra. CAMILA PAULA ROSSETTO PESCATORI JACON (Participação Virtual)
Pós-Doutoranda - Ciência Florestal, Solos e Ambiente / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu

Dr. BERNARDO MELO MONTES NOGUEIRA BORGES (Participação Virtual)
Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais

Prof. Dr. JOSE MAGNO QUEIROZ LUZ (Participação Virtual)
Departamento de / UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof. Dr. LEANDRO JOSE GRAVA DE GODOY (Participação Virtual)
Coordenadoria do Curso de Engenharia Agrônômica / UNESP - Câmpus de Registro

Botucatu, 28 de janeiro de 2022



Aos meus pais, **Antônio José Lopes e Maria Luiza Caetano Lopes**, que acreditaram na minha capacidade, incentivaram-me, dando-me força, e lutaram junto comigo para que meu sonho pudesse ser realizado.

Ao meu marido **Saulo Strazeio Cardoso**, pelo amor e carinho, pela paciência durante todos esses anos, e pela compreensão da minha ausência.

OFEREÇO

Tio Pizula (Wilson Lopes), é tão difícil pensar que não está mais entre nós, que o seu sorriso luminoso não mais poderá ser visto neste mundo e que a sua risada não voltará a entoar nos meus ouvidos.

Nossa família perdeu alguém muito especial, alguém cuja beleza vinha de dentro e que tinha a rara capacidade de fazer com que os outros mostrassem o seu melhor lado.

Te amamos!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por mais um obstáculo vencido, pois foi no Senhor que encontrei forças para me recompor nas horas mais difíceis desta caminhada.

Aos meus pais, Antônio José Lopes e Maria Luiza Caetano Lopes, por sempre estarem ao meu lado apoiando e incentivando minha vida profissional.

Ao meu irmão Mario Cesar Lopes, sua esposa Ana Paula e minha sobrinha Ana Sophia, pelo apoio, amizade e pelos momentos de descontração.

Ao meu marido Saulo, por ser companheiro inseparável, pelo carinho, incentivo, pela ajuda nos momentos difíceis e pela compreensão e paciência nos longos anos de distância.

A todos os meus familiares, em especial a minha amiga e prima Andreza Lopes do Carmo, pela ajuda na parte experimental do trabalho e pelo exemplo de caráter, dignidade e determinação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Roberto Lyra Villas Bôas, pela imensurável cooperação, paciência, ensinamentos, amizade e confiança depositada em mim durante esses cinco anos de orientação e convívio. Obrigada também pelas críticas que contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fernando Broetto, pelos ensinamentos, paciência, confiança, amizade e pela parceria na condução do experimento.

Ao professor Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa e a assistente de suporte acadêmico Cibele Regina de Souza Kruliski, por toda atenção e auxílio durante a realização das análises de razão isotópica no Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti”.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente da Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, em Botucatu-SP pela valiosa colaboração nas análises realizadas, ensinamentos e amizade.

Queria agradecer em especial ao técnico José Carlos Coelho, por todo o auxílio, paciência, ensinamentos, ideias, apoio, confiança e amizade durante esses cinco anos de convívio.

Agradeço às pós-doutorandas Caroline, Camila e Sílvia, por transmitirem seus conhecimentos, pelos auxílios sempre que necessitei e, além de tudo pela amizade.

A minha tia Oneida de Giácomo Strazeio, pela amizade, apoio e pela contribuição na correção gramatical e estilística do presente trabalho.

Às pós-graduandas Tatiane e Mara Lúcia, por toda a ajuda na realização das análises fisiológicas e bioquímicas do presente trabalho. E por todos os ensinamentos, conversas, risadas e amizade.

Às estagiárias Tainah e Luciana, por toda a ajuda na condução do experimento, pelas conversas, risadas e, acima de tudo amizade.

Aos amigos e amigas da pós-graduação Kamila, Matheus, Patrick, João Vitor, Maria Clara, Raquel, Sayuri, Estefânia, Rafaelly, Thais, Philippe, Amanda, Alessandro, por toda a ajuda, paciência e compreensão.

À banca examinadora de qualificação, pelas críticas e sugestões para a melhoria na qualidade desta tese.

Aos professores das disciplinas cursadas durante o doutorado.

À Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/Botucatu-SP.

Ao Conselho do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Horticultura), pela oportunidade de realizar o curso de doutorado.

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

**COMPARTILHO E DEDICO A VOCÊS ESTA MINHA VITÓRIA.
A TODOS MEU MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

Objetivou-se avaliar a viabilidade de extração de ácidos húmicos a partir de lodo de esgoto sanitário e seus efeitos sobre plantas de alface, em dois sistemas de cultivos (solo e hidroponia), comparados com o produto comercial. No experimento I foi realizada a extração de ácido húmico utilizando três tipos de materiais (lodo de esgoto estabilizado, compostado com bagaço de cana e in natura), empregando três metodologias para extração. Foram determinados os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio totais, razão isotópica de $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e composição nutricional, todos realizados em triplicatas. No experimento II o delineamento experimental foi em blocos casualizados, esquema fatorial 2 x 6, sendo duas fontes (ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto e ácido húmico comercial) e seis concentrações (0, 0,5, 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹), com quatro repetições e três plantas por parcela. As plantas de alface foram avaliadas por meio das seguintes variáveis: diâmetro do caule e da planta, comprimento do caule, altura da planta e números de folhas, massa fresca e seca da parte aérea, análise química de nutrientes da parte aérea, volume radicular, índice indireto de clorofila (SPAD) e pigmentos fotossintéticos. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a $p \leq 1\%$ e 5% de probabilidade e para o experimento II quando os dados foram significativos, foi realizado o estudo de regressão para as concentrações.

Palavras-chave: matéria orgânica; substâncias húmicas; métodos de extração; nutrição de plantas; isótopos.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the feasibility of extracting humic acids from sewage sludge and its effects on lettuce plants, in two cropping systems (soil and hydroponics), compared with the commercial product. In experiment I, the extraction of humic acid was carried out using three types of materials (stabilized sewage sludge, composted with sugarcane bagasse and in natura), using three methodologies for extraction. The percentages of total carbon, hydrogen and nitrogen, isotopic ratio of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ and $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ and nutritional composition were determined, all performed in triplicate. In experiment II, the experimental design was in randomized blocks, factorial scheme 2 x 6, with two sources (humic acid extracted from sewage sludge and commercial humic acid) and six concentrations (0, 0.5, 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0 mM of C L⁻¹), with four replications and three plants per plot. Lettuce plants were evaluated using the following variables: stem and plant diameter, stem length, plant height and number of leaves, shoot fresh and dry mass, chemical analysis of shoot nutrients, root volume, indirect chlorophyll index (SPAD) and photosynthetic pigments. The data were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test at $p \leq 1\%$ and 5% of probability and for experiment II when the data were significant, the regression study was carried out for the concentrations.

Keywords: organic matter; humic substances; extraction methods; plant nutrition; isotopes.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 – VIABILIDADE DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDOS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO

- Figura 1 - Filtragem do precipitado de ácido húmico através de membrana de diálise de massa molar de 1000D 29
- Figura 2 - Separação das frações ácido húmico (precipitado) e ácido fúlvico (sobrenadante) após decantação de 18 horas 31

Capítulo 2 – DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDAS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO EM PLANTAS DE ALFACE

- Figura 1 - Temperatura média do ar e umidade relativa média durante o 1º ciclo com 44 dias de cultivo (inverno: 30/06/2020 a 12/08/2020) 51
- Figura 2 - Temperatura média do ar e umidade relativa média durante o 2º ciclo com 39 dias (primavera: 16/10/2020 a 23/11/2020) 52
- Figura 3 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para o teor de clorofila *a* e *b* de plantas de alface 57
- Figura 4 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para massa fresca da parte aérea de plantas de alface 61
- Figura 5 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para o diâmetro da planta, massa seca da parte aérea e volume radicular de plantas de alface 64
- Figura 6 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para os teores de K, Ca e Mg de plantas de alface 67
- Figura 7 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para os teores de B, Fe e Mn de plantas de alface 71

Capítulo 3 – DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDAS DE LODO DE ESGOTO EM PLANTAS DE ALFACE CULTIVADAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO

- Figura 1 - Oxigenação individual da solução nutritiva por borbulhamento com ar comprimido 87
- Figura 2 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para o teor de clorofila *a* e carotenoides de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico 91
- Figura 3 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para massa fresca da parte aérea, número de folhas e altura de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico 96
- Figura 4 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para o diâmetro da planta, massa seca da parte aérea e volume radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico 100
- Figura 5 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para os teores de N e K de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico 104
- Figura 6 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para os teores de B, Cu, Fe, Mn e Zn de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico 108

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - VIABILIDADE DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDOS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO

Tabela 1 - Composição química dos lodos de esgoto utilizados no experimento..... 27

Tabela 2 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo no rendimento total dos ácidos húmicos extraídos 33

Tabela 3 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo na concentração de carbono, hidrogênio e nitrogênio totais contidos nos ácidos húmicos extraídos 35

Tabela 4 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo na abundância natural de $\delta^{13}\text{C}$ contido nos ácidos húmicos extraídos 38

Tabela 5 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo na abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ contido nos ácidos húmicos extraídos40

Capítulo 2 - DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDAS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO EM PLANTAS DE ALFACE

Tabela 1 - Análise química do solo utilizado no experimento 52

Tabela 2 - Análise química do ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto in natura 53

Tabela 3 - Níveis de garantia do produto comercial utilizado no experimento 53

Tabela 4 - Teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides em plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos 57

Tabela 5 - Massa fresca da parte aérea, número de folhas, comprimento do caule, diâmetro do caule e altura de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos 59

Tabela 6 - Diâmetro da planta, massa seca da parte aérea, volume radicular e índice indireto de clorofila (SPAD) de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos 63

Tabela 7 - Teores de macronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos 66

Tabela 8 - Teores de micronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos 69

Capítulo 3 - DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDAS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO EM PLANTAS DE ALFACE CULTIVADAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO

Tabela 1 - Análise química do ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto “in natura” 85

Tabela 2 - Níveis de garantia do produto comercial utilizado no experimento 86

Tabela 3 - Solução nutritiva utilizada nos ensaios experimentais 86

Tabela 4 - Solução nutritiva estoque utilizada nos ensaios experimentais 87

Tabela 5 – Teor de clorofila *a*, *b* e carotenoides em plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico 91

Tabela 6 - Massa fresca da parte aérea, número de folhas, comprimento do caule, diâmetro do caule e altura de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico 95

Tabela 7 - Diâmetro da planta, massa seca da parte aérea, volume radicular e índice indireto de clorofila (SPAD) de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico 99

Tabela 8 - Teores de macronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico 103

Tabela 9 - Teores de micronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico 107

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO GERAL	19
	CAPÍTULO 1 – VIABILIDADE DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDO A PARTIR DE LODO DE ESGOTO	23
1.1	INTRODUÇÃO	25
1.2	MATERIAL E MÉTODOS	27
1.2.1	Localização da área experimental.....	27
1.2.2	Delineamento experimental	27
1.2.3	Lodo de esgoto	27
1.2.4	Método I: Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS)	28
1.2.5	Método II: Instrução Normativa nº 28 de 27 de julho de 2007	29
1.2.6	Método III: Comunicado Técnico nº 16 (Benites et al., 2003)	30
1.2.7	Avaliações	31
1.2.7.1	Rendimento dos ácidos húmicos extraídos	31
1.2.7.2	Concentração de carbono, hidrogênio e nitrogênio totais dos ácidos húmicos extraídos	31
1.2.7.3	Análise da razão isotópica de ¹³ C e ¹⁵ N dos ácidos húmicos extraídos ...	32
1.2.8	Análise estatística	32
1.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
1.4	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	CAPÍTULO 2 – DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDAS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO EM PLANTAS DE ALFACE	47
2.1	INTRODUÇÃO	49
2.2	MATERIAL E MÉTODOS	50
2.2.1	Localização e caracterização da área experimental	50
2.2.2	Delineamento experimental	51
2.2.3	Clima	51
2.2.4	Solo	52
2.2.5	Caracterização dos tratamentos	52
2.2.6	Características do material vegetal utilizado no experimento	53
2.2.7	Irrigação e adubação.....	54
2.2.8	Avaliações	54

2.2.8.1	Análises biométricas	54
2.2.8.2	Volume radicular	55
2.2.8.3	Análise química da parte aérea	55
2.2.8.4	Teores de pigmentos fotossintéticos	55
2.2.8.5	Índice indireto de clorofila	56
2.2.9	Análise estatística	56
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
2.4	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO 3 – DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDAS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO EM PLANTAS DE ALFACE CULTIVADAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO		
		81
3.1	INTRODUÇÃO	83
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	84
3.2.1	Localização e caracterização da área experimental	84
3.2.2	Delineamento experimental	85
3.2.3	Caracterização dos tratamentos	85
3.2.4	Elaboração e manejo da solução nutritiva	86
3.2.5	Características do material vegetal utilizado no experimento	88
3.2.6	Avaliações	88
3.2.6.1	Análises biométricas	88
3.2.6.2	Volume radicular	88
3.2.6.3	Análise química da parte aérea	89
3.2.6.4	Teores de pigmentos fotossintéticos	89
3.2.6.5	Índice indireto de clorofila	90
3.2.7	Análise estatística	90
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.4	CONCLUSÃO	110
	REFERÊNCIAS	111
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	120
	REFERÊNCIAS	121

INTRODUÇÃO GERAL

As quantidades de lodo de esgoto (LE) geradas como um resíduo das Estação de Tratamento de Esgoto (ETEs) são cada vez mais elevadas e, por isso, a reciclagem desse resíduo vem ganhando cada vez mais importância. Uma das formas mais racionais de utilização do LE, sobretudo após o resíduo ter sido compostado ou estabilizado, é empregá-lo na agricultura (BOWSZYS et al., 2009; WIECZOREK; FRĄCZEK, 2013).

Esse composto apresenta ótimas perspectivas de uso no solo para fins agrícolas, por fornecer matéria orgânica, macronutrientes e micronutrientes, melhorando a fertilidade do solo e aumentando as produtividades das culturas (BETTIOL et al., 2004; SANTOS et al., 2014; CATOLICO et al., 2015), especialmente em países de clima tropical como o Brasil, onde os solos são pobres em matéria orgânica e nutrientes em decorrência da ação do clima.

O LE tem em sua composição aproximadamente 40% de material orgânico (LOPES, 2018), e por isso, apresenta potencial como fonte para substâncias húmicas (SHs). A maior parte das SHs utilizadas em fertilizantes orgânicos no mundo é derivada de leonardita, material com teor de SHs superior a 90%. Entretanto, no Brasil, não há descrição de fontes de leonardita, fato que incentiva a procura de alternativas como matéria-prima (SAITO; SECKLER, 2014).

De forma simplificada, pode-se dizer que as SHs são compostos orgânicos condensados, oriundos da ação microbiana no solo (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014). Entretanto, essa definição de SHs não é vinculada ao conhecimento exato da sua forma e massa molecular, pois os processos bioquímicos relacionados à formação do húmus não são totalmente esclarecidos.

Segundo Stevenson (1994) e Meng et al. (2017), as SHs podem ser subdivididas em três frações principais: ácido húmico (AH) (solúvel em álcali), ácido fúlvico (AF) (solúvel em ácido e álcali) e humina (HU) (insolúvel em ácido e álcali), sendo os principais componentes do carbono orgânico do solo.

Estimou-se que a concentração de SHs na solução do solo pode chegar a 250 mg L⁻¹ (GERKE, 1993) e alguns trabalhos evidenciaram que, sob condições hidropônicas, mesmo as concentrações menores (5 mg L⁻¹) poderiam determinar efeitos sobre a nutrição e crescimento das plantas (CACCO et al., 2000; CANELLAS et al., 2002; VACCARO et al., 2015).

Os AHs constituem a fração reativa mais estável da matéria orgânica, cujas moléculas são solúveis em meio alcalino, e, insolúveis em meio ácido (CANELLAS et al., 2001). Essa fração constitui um dos mais importantes componentes das SHs, que são derivados principalmente da degradação bioquímica de resíduos de plantas e animais pela atividade sintética microbiana (GULSER et al., 2010).

Dentro deste contexto, a busca da maior eficiência do aproveitamento de nutrientes tem sido relatada em trabalhos com uso de AH. Em um estudo realizado por Zanin et al. (2018), utilizando uma fração de AH extraído de turfa em plântulas de milho cultivadas hidronicamente, os resultados indicaram que os sistemas de transporte de nitrato de alta afinidade são induzidos pelo próprio substrato e que houve aquisição acelerada de nitrato nas raízes do milho quando adicionado AH à solução.

Estudos anteriores também relataram o efeito estimulador dos AHs na captação de nitrato em outros híbridos de milho (PINTON et al., 1999; QUAGGIOTTI et al., 2004; TOMASI et al., 2009) e em outras espécies vegetais (CACCO et al., 2000; NARDI et al., 2000; KEELING et al., 2003; TAVARES et al., 2016).

Seu uso como fertilizante pode melhorar as propriedades hidrofísicas do solo e a disponibilidade de nutrientes, gerando o aumento da eficiência fotossintética (RADY et al., 2016) e da produtividade das culturas em solos salinos (OSMAN; RADY, 2012). Zanin et al. (2018), sobre a resposta de plântulas de milho ao tratamento com AH, forneceu evidências claras de que a aquisição de nitrato pode ser induzida mesmo quando há carência do elemento na solução nutritiva, corroborando com as respostas observadas em milho e trigo por Pinton et al. (1999) e Cacco et al. (2000).

Keeling et al. (2003) e Jannin et al. (2012) evidenciaram que moléculas húmicas são capazes de estimular a absorção de nitrato e a atividade da membrana plasmática $H^+ -ATPase$ nas raízes e alterações de distribuição de nitrato e citocinina (MORA et al., 2010). Os estudos realizados por Baldotto et al. (2011) e Canellas; Olivares (2014), mostram que houve indução à formação de raízes laterais nas plantas de alface, promovendo um aumento de bombas de prótons nas membranas biológicas, tornando-as mais eficientes energeticamente e no transporte de nutrientes.

Estudos realizados por Kaiser; Huber (2001) mostraram uma relação negativa da falta de CO_2 e a inatividade da enzima redutase do nitrato, indicando que a fotossíntese é requerida para a ativação da enzima. Os mesmos autores constataram que a redução do nitrato é sensível à resistência estomática, de maneira que nas

plantas com estômatos fechados, a taxa fotossintética e a atividade da enzima de assimilação são afetadas.

Dentre os efeitos mais frequentes relatados da utilização de AH nas plantas está o de estimular o crescimento radicular (SILVA et al., 2011) como consequência do desencadeamento de maior expressão da enzima H + ATPase, semelhante ao proporcionado pelo hormônio auxina (CANELLAS et al., 2009). Algumas características positivas com a utilização de AH também foram relatadas por Pinton et al. (1997); Pinton et al. (1999); Canellas et al. (2002); Nardi et al. (2002); Zanin et al. (2015), Canellas et al. (2015) e Zamboni et al. (2016), como a melhoria da biomassa total da planta, a absorção de íon pela raiz, a acidificação da rizosfera pelas raízes e a alocação de nutrientes nas folhas.

Resultados positivos para desenvolvimento de raízes foram encontrados por Bettoni et al. (2016), que relatam aumento no crescimento das raízes com o uso de SHs em plântulas de cebola cultivadas organicamente. Rosa et al. (2009), com a utilização de frações solúveis de SHs (AH+AF) extraídas de carvão mineral, notaram que a massa seca da raiz de plantas de feijão aumentou linearmente até a maior dose de SHs testada (20 mg L⁻¹ de C), sendo 41% superiores ao tratamento sem SHs (testemunha).

Por meio de análises morfológicas de raízes de milho, Canellas et al. (2002) observaram que o tratamento com AH estimulou claramente o número de locais de emergência lateral da raiz a um nível variável entre 7 e 12 vezes os valores do controle. Outros autores obtiveram resultados positivos no crescimento da parte aérea e raízes de plantas de aveia, azevém e alface, utilizando doses entre 10 e 25 mg de C L⁻¹ das SHs extraídas de solo, carvão e vermicomposto, respectivamente (PINTON et al., 1999; SILVA et al., 2000; RODDA et al., 2006), porém ainda são incipientes os resultados para SHs extraídas de LE.

É reconhecida a ligação de cátions à SHs, devido à presença de grupos funcionais ácidos, como os grupos carboxílicos e fenólicos (MASINI, 1998). Por meio dessa informação, foi levantada a hipótese de que o tamanho e peso das moléculas húmicas afetariam a complexação de traços metálicos (CABANISS, 2000) e que o peso molecular da fração de AH está diretamente ligado aos benefícios proporcionados às plantas.

Os efeitos fisiológicos específicos das SHs nas plantas são em função da fonte, concentração e peso molecular das frações húmicas aplicadas (NARDI et al., 2002).

Bai et al. (2019) citam que, geralmente, as frações de pesos moleculares menores têm maior capacidade de ligação do que frações com pesos moleculares maiores, devido às diferenças no conteúdo dos grupos funcionais. Estas diferenças de tamanho e peso ocorrem,

pois as SHs produzidas podem ser modificadas por polimerização, resultando em uma diversidade de pesos moleculares que variam de 500 a 1.000.000 D (PICCOLO et al., 2002).

Em um estudo avaliando-se três diferentes extratos húmicos: carvão oxidado, Leonardita da Dakota do Norte e de um solo orgânico, Piccolo et al. (1992) relataram que as frações húmicas de menor tamanho molecular mostraram o maior efeito sobre a absorção de nitrato e atividade hormonal. Devido a isso, justifica-se a realização das análises isotópicas dos AHs extraídos de LE, as quais pretendem encontrar uma assinatura isotópica a partir da composição dos isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio, a fim de diferenciá-los e avaliá-los quanto ao seu peso molecular.

A utilização exógena de SHs nos sistemas agrônômicos pode ser introduzida como auxílio no desenvolvimento sustentável. Atualmente a maioria das SHs utilizadas na agricultura é derivada de recursos não renováveis, como turfa e carvão; e com o aumento dessa tecnologia também exige a busca por novas fontes sustentáveis de produtos húmicos, por exemplo, resíduos orgânicos (CANELLAS et al., 2015).

A resposta das plantas à aplicação de AH não é análoga, variando de acordo com a matéria-prima das quais esses compostos são extraídos, a sua concentração e o genótipo da planta (BALDOTTO et al., 2012). A origem distinta das SHs varia significativamente segundo as quantidades de diferentes grupos funcionais (CHRISTL; KRETZSCHMAR, 2001), por isso a importância da caracterização química do material.

A proposta deste trabalho, de produzir AHs a partir de LE, abre uma nova possibilidade de agregar valor a esse resíduo e permitir o seu uso como nova fonte sustentável de produtos húmicos, com segurança na área agrícola. Dessa forma, o objetivo geral desse trabalho foi avaliar a viabilidade de extração de AHs de LE sanitário e seus efeitos sobre plantas de alface em dois sistemas de cultivo (solo e hidroponia) comparado com AH comercial.

CAPÍTULO 1

VIABILIDADE DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDO A PARTIR DE LODO DE ESGOTO

RESUMO

No presente trabalho, foi estudada a extração de ácidos húmicos (AH) de três tipos de lodo de esgoto (LE): 1 - estabilizado, 2 - compostado com bagaço de cana e 3 - "in natura", empregando-se três métodos: I - Método descrito pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas, II - Método descrito na Instrução Normativa nº 28 de 27 julho de 2007, do MAPA e III - Método descrito no Comunicado Técnico nº 16, (Benites et al., 2003.) Foram determinados os parâmetros de rendimento total, concentração e quantificação de carbono, hidrogênio e nitrogênio e razão isotópica de ^{13}C e ^{15}N dos AHs extraídos de diferentes LE. O método III destacou-se positivamente para o rendimento total dos AHs extraídos e para a quantidade em mg de carbono, hidrogênio e nitrogênio. Em contrapartida, o método I, apresentou os maiores valores para concentração de carbono, hidrogênio e nitrogênio nos AHs, em relação ao método II e III. Para a razão isotópica de ^{13}C e ^{15}N dos AHs, foi possível observar diferenças significativas tanto para os materiais extraídos, quanto para os métodos utilizados nas extrações.

Palavras-chave: substâncias húmicas; razão isotópica; composição elementar; métodos.

ABSTRACT

In the present work, the extraction of humic acids (HA) from three types of sewage sludge (LE) was studied, (1) - stabilized), (2) - composted with sugarcane bagasse and (3) - "in natura", using three methods: (I) - Method described by the International Humic Substances Society, (II) - Method described in Normative Instruction No. 28 of July 27, 2007, from MAPA and (III) - Method described in Technical Communication n° 16, (Benites et al., 2003.) The parameters of total yield, concentration and quantification of carbon, hydrogen and nitrogen and isotopic ratio of ^{13}C and ^{15}N of the HAs extracted from different LE were determined. Method III stood out positively for the total yield of the extracted HAs and for the quantity in mg of carbon, hydrogen, and nitrogen. In contrast, method I presented the highest values for carbon, hydrogen, and nitrogen concentration in HAs, in relation to method II and III. For the ^{13}C and ^{15}N isotope ratio of the HAs, it was possible to observe significant differences both for the extracted materials and for the methods used in the extractions.

Keywords: humic substances; isotopic ratio; elementary composition; methods.

1.1 INTRODUÇÃO

Durante a etapa de tratamento de esgoto realizado pelas Estações de Tratamentos de Esgoto (ETEs), é gerado um subproduto denominado lodo de esgoto (LE), cuja disposição constitui um problema mundial cada vez mais grave. Geralmente, esse resíduo tem como destinação final os aterros sanitários, porém essa não é a alternativa mais adequada, em razão dos altos níveis de poluentes orgânicos e inorgânicos liberados do lixiviado, já que esses resíduos possuem elevada umidade e vão liberando chorume ao longo do tempo. Desse modo, faz-se necessário o estudo de métodos apropriados de tratamento e descarte desse resíduo para evitar a contaminação do solo e dos recursos hídricos (LABANOWSKI et al., 2010; KUMARI et al., 2016).

Uma das estratégias adequadas para o tratamento e posterior uso desse resíduo é a sua compostagem, processo de transformação microbiana controlada de matéria orgânica com material estrutural (AUBAIN et al., 2002), onde parte da matéria orgânica é mineralizada em dióxido de carbono, amônia e água, enquanto a outra parte é transformada em SHs, que são estruturalmente análogas às encontradas nos solos (HERNANEZ-APAOLAZA et al., 2000).

As SHs podem ser definidas como macromoléculas e misturas heterogêneas, formadas pela biodegradação de resíduos vegetais e animais, sendo divididas em diferentes frações: ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) e humina (HU) (SHAHBAZI; MARZI; TABBAKHIAN, 2019). Estas substâncias influenciam a fertilidade do solo, melhorando a estrutura, a porosidade e o fornecimento de nutrientes (BRONICK; LAL, 2005; NARDI et al., 2009). Nas plantas, induzem processos fisiológicos, aumentando o crescimento, a absorção de nutrientes e o rendimento das culturas (NARDI et al., 2002).

Devido a sua atual importância, as frações húmicas vêm sendo pesquisadas em vários países, principalmente no que se refere à matéria-prima utilizada para extração como: carvões de baixa qualidade e seus resíduos, solo, resíduos de culturas agrícolas, composto, lixiviado de aterro sanitário, resíduos animais e lodo de esgoto (DAS, et al., 2015; AL-FAIYZ, 2017; GUSIATIN et al., 2017; MOROZESK et al., 2017; WU et al., 2017).

Para Zara et al. (2017) a quantidade de AH extraível depende de vários fatores, como o tipo de material orgânico, método e solução extratora, temperatura e tamanho de partícula do substrato. Atualmente, existem várias metodologias descritas para a

extração de SHs, que variam quanto ao processo de extração, quantidade de material utilizado; aos extratores; tempo e velocidade de centrifugação; filtração; utilização de atmosfera de N₂ e purificação.

Durante a revisão realizada para a elaboração do presente trabalho, não foi encontrada nenhuma metodologia específica para a extração de AH a partir de LE. Devido a isso, foi necessário testar três diferentes metodologias com o objetivo de obter um AH de qualidade e com rendimento satisfatório a partir da interação do método com o material.

A primeira metodologia testada foi descrita pela Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), método mais difundido internacionalmente. Esse método foi utilizado nos trabalhos de Kuwatsuka et al. (1992), Asing et al. (2009) e Conselvan et al. (2018) para extração de SHs de turfa, composto orgânico e, carvão. Esse método apresenta grande relevância, é utilizado mundialmente, consegue extrair SHs de qualidade e com alto grau de pureza, porém apresenta, alto grau de laboriosidade na sua execução (BENITES et al., 2003) o que dificulta o seu uso em grande escala.

A segunda metodologia, considerada como oficial do Brasil, é descrita pela Instrução Normativa nº 28 de 27 julho de 2007/MAPA, sendo indicada para fertilizante orgânico, que é definido como produto de natureza fundamentalmente orgânica, obtido por processo físico, químico, físico-químico ou bioquímico, natural ou controlado, a partir de matérias-primas de origem industrial, urbana ou rural, vegetal ou animal, enriquecido ou não de nutrientes minerais.

A terceira metodologia é descrita no Comunicado Técnico nº 16 (MAPA, Benites et al., 2003) que consiste em uma modificação na metodologia descrita pela IHSS, visando à quantificação das frações húmicas por meio de procedimento simplificado e de fácil execução, com o objetivo de suprir a alta demanda por extração e quantificação de SHs dos laboratórios nacionais. A metodologia adaptada apresentou resultados considerados satisfatórios para o emprego como análise de rotina pelos laboratórios.

Pela complexidade metodológica exposta e pela ausência de métodos específicos para a extração de SHs de materiais de origem distinta, objetivou-se nesse trabalho avaliar a viabilidade das três metodologias para extração de AH de três diferentes composições de LE sanitário e a posterior caracterização do AH extraído.

1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Localização da área experimental

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Fertilidade do Solo, do Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, em Botucatu-SP.

1.2.2 Delineamento experimental

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x3, com três repetições. Os fatores avaliados foram três metodologias de extração de AHs em solos: Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), Instrução Normativa SDA nº 28 de 27 julho de 2007 (IN nº 28) do MAPA e Comunicado Técnico nº 16 (MAPA, Benites et al., 2003) e três tipos de lodo de esgoto (LE): estabilizado, compostado com bagaço de cana e in natura.

1.2.3 Lodo de esgoto

O LE utilizado foi proveniente da ETE- Lageado, da cidade de Botucatu. Para a extração de AH foram utilizados três tipos de materiais: LE estabilizado (secagem e compostagem em leiras durante 66 dias), LE compostado (mistura de LE + bagaço de cana na proporção 1:1 compostado por 45 dias), LE in natura (recém-saído da centrífuga com aproximadamente 85% de umidade). Os três materiais utilizados no experimento foram caracterizados quimicamente segundo a metodologia oficial do MAPA, no Laboratório do Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, em Botucatu-SP. Todos os resultados estão apresentados na base seca, com exceção do pH, apresentado em base úmida (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição química dos lodos de esgoto utilizados no experimento

LE	C/N	pH	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	Ca	Mg	S	M.O	C.O
----- % -----										
1	7/1	5,9	3,72	3,65	0,14	1,45	0,30	3,01	44	24
2	9/1	5,7	2,90	3,42	0,12	1,32	0,28	2,16	46	26
3	8/1	6,3	2,97	2,94	0,28	1,57	0,46	2,07	45	28
LE	Na	B	Cu	Fe	Mn	Zn				
-----mg kg ⁻¹ -----										
1	2020	112	206	33100	348	784				
2	1800	146	92	46900	326	604				
3	1286	97	275	36482	329	941				

LE: 1: estabilizado; 2: compostado com bagaço de cana de açúcar e 3: "in natura"

1.2.4 Método I: Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS)

Para cada material foram pesados 200 g de LE, após as amostras serem secas em estufa a 65°C e moídas até passarem totalmente em peneira com malha de 0,5 mm de abertura, foram divididas em três repetições de 66,6 g. Em seguida as amostras foram transferidas para frascos de 2000 ml, aos quais foram adicionados 670 ml de HCl 0,1 mol L⁻¹ para fornecer uma proporção final de 10 ml de líquido para cada 1 g de amostra seca. O material foi agitado por cerca de uma hora e submetido à centrifugação (2500 rpm) por 15 minutos, possibilitando a liberação de íons metálicos fracamente ligados à estrutura do material húmico. Posteriormente, foi acertado o pH do meio em 7,0 com NaOH 1,0 mol L⁻¹ e foram adicionados 670 ml de NaOH 0,1 mol L⁻¹ sob atmosfera de N₂, para obter a razão final de extração 10:1. Para conseguir adicionar NaOH 0,1 mol L⁻¹ sob atmosfera de N₂ foi necessária a colocação de uma caixa de papelão sobre uma bancada. Após isso, realizou-se uma pequena abertura frontal na caixa, pela qual era possível a passagem somente dos braços de quem iria colocar o NaOH nos frascos e uma abertura lateral da largura da mangueira a qual levava o gás para dentro da caixa. Em seguida, o material foi agitado por cerca de quatro horas e depois deixado em repouso por uma noite.

Na sequência, o pH do sobrenadante foi abaixado até 1,0 com HCl 6,0 mol L⁻¹ e o material foi deixado em repouso por 16 horas. Ao término desta etapa, o precipitado (AH) foi isolado por centrifugação (2500 rpm) por 15 minutos e a solução sobrenadante (AF) foi descartada. O precipitado de AH foi redissolvido com adição de um volume mínimo de hidróxido de potássio (KOH 0,1 mol L⁻¹) sob atmosfera de N₂, e em seguida adicionado cloreto de potássio sólido (KCl 0,3 mol L⁻¹), a floculação e separação destes colóides inorgânicos foram realizadas por centrifugação a (2500 rpm) por 15 minutos. O AH foi reprecipitado adicionando-se HCl 6,0 mol L⁻¹ sob agitação constante e ajustando-se o pH do meio sobrenadante em 1,0. Após essa etapa, a suspensão foi deixada em repouso por 16 horas para precipitação do AH, seguindo-se outra etapa de centrifugação (2500 rpm) por 15 minutos e em seguida o descarte do sobrenadante resultante desta etapa. Em um recipiente plástico, o precipitado de AH foi ressuspenso em HCl 0,1 mol L⁻¹ e HF 0,3 mol L⁻¹, e deixado sob agitação por uma noite à temperatura ambiente. Essa parte do processo possibilita a destruição de sílica e silicatos, abaixando consideravelmente o teor de cinzas do AH gerado. Após essa etapa, ocorreu a centrifugação (2500 rpm) por 15 minutos e posterior descarte do sobrenadante.

Finalmente, o conteúdo obtido foi dialisado em membranas com corte de massa molar de 1000 Daltons até não se detectar cloro (Cl^-) na solução externa (água destilada deionizada) à membrana (Figura 1). Para a avaliação da presença de Cl^- na solução externa à membrana foi empregado o método de Mohr. O método de Mohr consiste na coleta de amostras de 100 mL da solução externa à membrana durante a filtração e agitação do AH. Após isso, foi adicionado 1 mL da solução indicadora de cromato de potássio (K_2CrO_4) e titulou-se com solução de nitrato de prata (AgNO_3) $0,050 \text{ mol L}^{-1}$, até a formação e persistência de um precipitado de coloração vermelho-tijolo de cromato de prata (Ag_2CrO_4), na região do ponto de equivalência, havendo presença de cloreto. Quando era detectada a presença de cloreto, a solução externa (água destilada deionizada) era renovada. Essa etapa foi refeita várias vezes até constatar a não formação do precipitado de coloração vermelho-tijolo de cromato de prata visivelmente, ou seja, até a concentração livre de Cl^- ser menor que $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O branco foi feito para a confirmação, utilizando água destilada deionizada no lugar da amostra. As amostras foram colocadas para secar em estufa a 60°C , por quatro horas.

Figura 1 - Filtração do precipitado de ácido húmico através de membrana de diálise de massa molar de 1000D



Fonte: Marcela Caetano Lopes -2020

1.2.5 Método II: Instrução Normativa SDA Nº 28, De 27 de julho de 2007

Para cada material foram pesados 48,75 g de LE, após as amostras serem secas em estufa a 65°C e moídas até passarem totalmente em peneira com malha de 0,5 mm de abertura, foram então divididas em três repetições de 16,25 g. Nesse

momento, cada repetição de 16,25 g foi dividida novamente em 13 amostras de 1,25 g e transferidas para frascos de 250 ml. Em seguida acrescentaram-se 100 mL da solução extratora de pirofosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, recém-preparada, o frasco foi tampado e agitado por 30 minutos em agitador Wagner a 40 rpm.

O conteúdo de cada frasco de 250 mL foi transferido para dois tubos de centrífuga de 50 ml e ajustado à velocidade da centrífuga para 2000 g (força) por 15 minutos. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para balão volumétrico de 1000 mL e foi repetida a operação de centrifugação por cinco vezes, adicionando alíquotas de 50 mL da solução extratora em cada tubo, em função da amostra, até que o líquido de extração ficasse levemente corado. Reuniram-se todos os extratos no balão volumétrico de 1000 mL e, após, completado o volume com água destilada, homogeneizou-se e obteve-se a solução com o extrato húmico total.

Para o fracionamento, foram retiradas alíquotas de 100 mL da solução do extrato húmico total e acrescentou-se ácido sulfúrico a 20% (v/v), agitou-se lentamente até pH 1. Após essa etapa, foi deixado em repouso por um período de 8 horas, para a separação dos ácidos húmicos. Centrifugou-se novamente a 2000 g (força) por 15 minutos e comprovou-se visualmente a separação do precipitado de ácidos húmicos. As amostras foram colocadas para secar em estufa a 60°C , por quatro horas.

1.2.6 Método III: Comunicado Técnico nº 16 MAPA (Benites et al., 2003)

Para cada material foram pesados 5,28 g de LE, após as amostras serem secas em estufa a 65°C e moídas até passarem totalmente em peneira com malha de 0,5 mm de abertura, e divididas em três repetições de 1,76 g. Transferiu-se a amostra para tubo de centrífuga de 50 mL com tampa e adicionaram-se 20 mL de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, agitando manualmente, deixando em repouso por 24 horas. Após esse processo, levou-se à centrifugação a 5.000 g (força) por 30 minutos, em seguida o sobrenadante foi recolhido e reservado. Foram adicionados mais 20 mL de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a cada amostra, agitando-se manualmente até o desprendimento e ressuspensão do precipitado. Na sequência deixou-se em repouso por 1 hora e centrifugou novamente a 5.000 g (força) por 30 minutos, onde o sobrenadante foi recolhido e armazenado junto ao previamente reservado. O precipitado retido no tubo Falcon corresponde à fração HU e foi descartado.

Ajustou-se o pH de todo o sobrenadante reservado durante o processo para pH 1,0 ($\pm 0,1$), pela adição de gotas de solução de H_2SO_4 20% dentro de tubos Falcon de 50 ml e deixado decantar por 18 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 5.000 g (força) por 30 minutos para a separação das frações AF e AH (Figura 2). O sobrenadante resultante dessa etapa foi descartado, pois se tratava da fração AF. O precipitado de AH retido no tubo Falcon foi lavado com 20 ml de NaOH 0,1 mol L^{-1} e 20 mL de H_2O destilada, e em seguida centrifugadas a 5.000 g (força) por 30 minutos. As operações foram repetidas por três e duas vezes, respectivamente, sendo o sobrenadante descartado em todas as etapas. Ao final, as amostras foram colocadas para secar em estufa a 60°C, por quatro horas.

Figura 2 - Separação das frações ácido húmico (precipitado) e ácido fúlvico (sobrenadante) após decantação de 18 horas



Fonte: Marcela Caetano Lopes -2020

1.2.7 Avaliações

1.2.7.1 Rendimento dos ácidos húmicos extraídos (%)

Para determinar o percentual de rendimento do AH extraído a partir do LE, dividiu-se o valor da massa do AH extraído (g) pela massa total do LE (g), e o valor obtido foi multiplicado por 100, obtendo-se assim o rendimento em %.

1.2.7.2 Concentração de carbono, hidrogênio e nitrogênio totais dos ácidos húmicos extraídos (%)

Na realização de um pré-teste, verificou-se uma variação significativa no rendimento dos AHs extraídos pelos diferentes métodos utilizados, que podem ser decorrentes das diferenças dos procedimentos acima citados. Devido a isso, fez-se

necessário saber se haveria variações também na qualidade dos materiais gerados, sendo assim, foram determinados os percentuais de carbono, hidrogênio e nitrogênio totais dos AHs, em triplicata, por meio do Analisador Elementar Automático (modelo PE 2400 Series II, marca Perkin Elmer®). As análises foram realizadas no Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, em Botucatu-SP.

1.2.7.3 Análise da razão isotópica de ^{13}C e ^{15}N dos ácidos húmicos extraídos

As análises isotópicas foram realizadas para encontrar uma assinatura isotópica para cada AH extraído do LE a partir da composição dos isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio a fim de diferenciar os tipos de materiais (AHs), as metodologias utilizadas para extração e ainda avaliar seu peso molecular. As análises isotópicas de carbono e nitrogênio foram realizadas no Centro de Isótopos Estáveis “Prof. Dr. Carlos Ducatti” do Instituto de Biociências da UNESP/Botucatu. Para a análise isotópica foram determinadas as razões dos isótopos de carbono ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) e nitrogênio ($^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) por meio de um analisador elementar orgânico (OEA) acoplado a um espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) em um sistema de fluxo contínuo. Os resultados foram fornecidos em notação δ ($\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$) definida pela diferença relativa da razão isotópica da amostra pela razão isotópica do padrão internacional V-PDB para $\delta^{13}\text{C}$ e ar atmosférico para $\delta^{15}\text{N}$, expressas em ‰.

$$\delta (\text{‰}) = [(R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}) / R_{\text{padrão}}] \times 1000$$

1.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a $p \leq 1\%$ e 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Agroestat (Barbosa; Maldonado Júnior, 2015).

1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação aos métodos de extração empregados, verificou-se que o método III apresentou maior rendimento na separação dos AHs, diferindo significativamente dos demais métodos para todos os tipos de LE avaliados. Quando foi realizada a extração de AH do LE1, os métodos I e II não apresentaram diferença significativa na % de extração de AH. Entretanto, quando utilizou o LE2 e o LE3 houve diferença

significativa entre os métodos I e II, sendo observada maior % de rendimento com o método II (Tabela 2).

Tabela 2 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo no rendimento total dos ácidos húmicos (%) extraídos

MÉTODOS	TIPOS DE LODO		
	1	2	3
	----- % de AHs -----		
I	0,08aB	0,06aC	0,06aC
II	2,75aB	4,16aB	3,59aB
III	23,67bA	27,89aA	25,71abA
DMS (5%)		2,21	
CV (%)		10,87	
F Met. X Tipos de lodo		3,10*	

Tipos de lodo: 1 - LE estabilizado, 2 - LE compostado com bagaço de cana e 3 - LE in natura. Métodos: I (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), II (Instrução Normativa SDA nº 28 (MAPA, BRASIL, 2007) e III (Comunicado Técnico nº 16 (MAPA, Benites et al., 2003). * indica diferença a 5% e ** indica a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e ns = não significativo a ($p > 0,01$ ou a 0,05). Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si.

Durante a extração de SHs busca-se obter no final do processo um rendimento elevado, um baixo teor de cinzas e o mínimo de alterações estruturais. Contudo, essas propriedades são facilmente modificadas por parâmetros do próprio método de extração empregado (ZARA et al., 2017). Por meio dessa informação, é possível levantar a hipótese de que as características de cada método (quantidade de material, diferentes extratores, tempos e velocidades de centrifugação, filtração, utilização de atmosfera de N_2 e purificação) possam ter promovido variações no rendimento total dos AHs no presente trabalho.

Uma característica relevante dos métodos de extração testados, que facilmente é capaz de alterar os parâmetros finais das SHs é a solução extratora. No caso, o método I utilizou hidróxido de sódio ($NaOH$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como solução extratora, e posteriormente o hidróxido de potássio (KOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e cloreto de potássio sólido (KCl $0,3 \text{ mol L}^{-1}$) com o objetivo de reduzir o conteúdo de cinzas.

No método II a solução extratora utilizada foi pirofosfato de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($Na_4P_2O_7 \cdot 10H_2O$) em $NaOH$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ recém-preparada. Francioso et al. (1998) relatam que o uso do pirofosfato de sódio pode minimizar o efeito da auto-oxidação do material húmico extraído, porém pode apresentar maior conteúdo de silício e

agregar unidades de fosfato nas estruturas das SHs. Estudos realizados por Doskočil et al. (2018), avaliando o rendimento de AHs isoladas de sete amostras de lignito de seis bacias de carvões Europeus, utilizando a solução extratora supracitada, verificaram valores de rendimento entre 3,0% e 11,4% nas sete amostras de AHs.

O método III utilizou a solução extratora de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol L⁻¹), e apresentou os melhores resultados de rendimento, diferindo assim dos demais métodos avaliados. O resultado encontrado para essa variável no presente trabalho corrobora os de Rosa et al. (2000), que avaliando tipos e concentrações de soluções extradoras alcalinas para a extração de SHs em turfa, verificaram influência do hidróxido de sódio (NaOH) nas variáveis: tempo e a temperatura de extração, granulometria, rendimento, teor de cinzas e de AH e AF.

Deve-se considerar que o rendimento muito baixo apresentado pela metodologia I, inviabiliza a separação do AH das amostras, visto que os valores extraídos foram de 296 a 464 vezes menor que a separação pelo método III. Por mais reconhecimento que o método I tenha do ponto de vista de pesquisa, sua extração não permite que seja utilizado com objetivo de produção de AH dado o baixo rendimento de separação.

Na Tabela 3 encontram-se os resultados da composição elementar de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) totais contidas nos AHs extraídos pelas diferentes metodologias dos três tipos de LE. Para a concentração de carbono total, o LE2 gerou maior concentração de carbono quando utilizado o método I. No entanto, para o método II, o LE3 apresentou valores de carbono superiores ao LE1 e LE2. E para o método III, o LE1 e LE3 proporcionaram resultados superiores de carbono em relação ao LE2.

Tabela 3 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo na concentração de carbono (C), hidrogênio (H) e nitrogênio (N) totais contidos nos ácidos húmicos (%) extraídos

MÉTODOS	TIPOS DE LODO		
	1	2	3
Concentração de C nos AHs extraídos (%)			
I	40,80bA	48,89aA	42,91bA
II	11,87bC	11,55bB	16,19aC
III	22,19aB	13,55bB	24,48aB
Concentração de H nos AHs extraídos (%)			
I	4,94bA	5,53abA	6,10aA
II	1,79aC	1,91aB	2,29aC
III	2,68bB	1,46cB	3,54aB
Concentração de N nos AHs extraídos (%)			
I	7,16bA	6,72bA	9,43aA
II	1,62bB	1,18bB	2,46aB
III	1,86aB	1,14bB	2,22aB
DMS (1%)		3,20	
CV (%)		4,56	
F Met. X Tipos de lodo		51,83**	
DMS (1%)		0,80	
CV (%)		8,79	
F Met. X Tipos de lodo		10,52**	
DMS (1%)		0,62	
CV (%)		6,06	
F Met. X Tipos de lodo		17,41**	

Tipos de lodo: 1 - LE estabilizado, 2 - LE compostado com bagaço de cana e 3 - LE in natura. Métodos: I (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS)), II (Instrução Normativa SDA nº 28 (MAPA, BRASIL, 2007) e III (Comunicado Técnico nº 16 (MAPA, Benites et al., 2003)). * indica diferença a 5% e ** indica a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e ns = não significativo a ($p > 0,01$ ou a 0,05). Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si.

No trabalho realizado por Morozesk et al. (2017) houve extração de AHs do LE in natura pelo método da IHSS (método I neste trabalho) e encontraram o valor de 39,47% para o teor de C no material húmico. O resultado foi inferior ao encontrado no presente trabalho que também utilizou LE in natura e o método da IHSS, o valor encontrado foi de 42,91%.

A diferença encontrada nos valores para a variável nos dois trabalhos é justificada pela origem distinta dos LE. Os autores Shahbazi; Marzi; Tabbakhian,

(2019) relataram que a origem e idade dos materiais utilizados para extração, estão diretamente ligadas às variações de características das SHs extraídas, como composição, estrutura, peso molecular e posição dos grupos funcionais.

Entretanto, apesar de haver variações na composição elementar devido a diferentes características dos materiais de origem, Sutzkover-Gutman et al. (2010) descreveram que a composição elementar das SHs em geral contém de 40 a 60% de carbono. À vista disso, foi possível verificar a semelhança dos teores de C nos AHs extraídos de LE do presente trabalho com valores citados de AHs extraídos de diferentes materiais de origem em outras pesquisas.

Resultados encontrados por Rosa et al. (2000), que extraíram SHs de turfa utilizando soluções extratoras alcalinas, encontraram valores entre 22,31 e 27,59% para o teor de C, valores esses também encontrados no presente trabalho para o AH gerado a partir do LE1 e LE3 no método III. No caso do trabalho realizado por Katsumi et al. (2015) que analisaram teores de C em vinte e seis amostras de AHs extraídos de superfícies de solos virgens coletados no Japão, encontraram os teores entre 51,8 e 60,2%, valores esses que foram superiores aos verificados no presente trabalho.

Em relação à concentração de H total determinada nos AHs extraídos pelos diferentes métodos, observa-se que a concentração de H no AH oriundo do LE2 e LE3 foi significativamente maior que do AH oriundo do LE1 quando utilizado o método I. Em contrapartida, utilizando-se o método II, os AHs não apresentaram diferenças significativas entre si quanto à concentração de H. Quando foi utilizado o método III, a maior concentração de H foi obtida pelo AH extraído do LE3 dentre os três materiais avaliados. Sobre os métodos de extração testados no presente trabalho, observou-se que o AH extraído pelo método I foi significativamente superior para teores de H em relação aos métodos II e III para os três tipos de lodos (Tabela 3).

Dick et al. (1998) extraíram AH do lodo orgânico (LO), oriundo da fabricação de celulose, empregando dois métodos de extração: método I (solução extratora NaOH 0,5 mol L⁻¹ e método 2 (pirofosfato de sódio 0,15 mol L⁻¹). E concluíram que, o teor de H (6,7%) do AH extraído do LO com NaOH (método 1) foi estatisticamente superior. O resultado apresentado corrobora com o encontrado nesse trabalho, o qual obteve valor elevado para o teor de H do AH extraído do LE com solução extratora NaOH, independente dos lodos terem origens distintas.

Ao comparar resultados encontrados por outros autores para a concentração de H dos AHs extraídos de outras fontes e por outros métodos de extração, foi possível

detectar uma variação nesses resultados. No caso do trabalho realizado por Katsumi et al. (2015) com vinte e seis amostras de AHs extraídos de superfícies de solos virgens coletados no Japão, os teores foram de 3,10 a 5,71%, ao compará-los com os valores obtidos no presente estudo de 1,79 a 6,10%, foi possível notar uma maior variação. Na pesquisa realizada por Rosa et al. (2000), analisando a composição elementar das SHs extraídas de turfa, utilizando dois tipos de soluções extratoras (NaOH e KOH) e três concentrações (1,0 mol/L; 0,5 mol/L e 0,1 mol/L), foi constatado que os teores de H do AH foram de 4,44 a 6,35%.

A concentração de N foi significativamente superior para o AH oriundo do LE3 em relação aos AHs oriundos dos LE1 e LE2, para os métodos I e II. Para o método III, o AH oriundo do LE1 e LE3 não diferiram significativamente entre si, sendo estatisticamente superior ao LE2. Ao verificar o comportamento dos métodos de extração, pode-se concluir que o método I destacou-se significativamente em relação aos métodos II e III para os AHs oriundos de todos os LE avaliados (Tabela 3).

Os métodos II e III não apresentaram diferença significativa entre si, e as concentrações de N dos AHs variaram entre 1,18 e 2,46 % e 1,14 e 2,22%, para os métodos I e III, respectivamente. O método I apresentou concentrações mais elevadas para essa variável, variando de 6,72 a 9,43%. Uma hipótese para a diferença na concentração de N observada nos métodos avaliados é que os métodos II e III utilizam a solução de pirofosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (Na₄P₂O₇) em NaOH 0,1 mol L⁻¹ e hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol L⁻¹), respectivamente. E o método I utiliza solução extratora de (NaOH 0,1 mol L⁻¹) e (KOH 0,1 mol L⁻¹), possivelmente a diferença na solução extratora utilizada pode ter gerado essa variação entre os métodos.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rosa et al. (2000) ao analisarem os teores de N total em SHs extraídas de turfa, utilizando dois tipos de soluções extratoras (NaOH e KOH) e três concentrações (1,0 mol/L; 0,5 mol/L e 0,1 mol/L), os quais encontraram diferença significativa para o teor médio de N, utilizando solução extratora NaOH de 1,51% e para KOH de 0,59%. Essa diferença entre os teores de N das SHs pode indicar uma possível contaminação de substâncias de natureza não húmica (proteínas e aminoácidos) quando é utilizado NaOH na extração ou sugerir uma extração insatisfatória do material húmico por solução KOH.

Ao extrair AH do lodo orgânico, oriundo da fabricação de celulose, utilizando duas soluções extratoras: hidróxido de sódio (NaOH 0,5 mol L⁻¹) e pirofosfato de sódio (Na₄P₂O₇ - 0,15 mol L⁻¹), concluíram que, o teor de N do AH extraído com Na₄P₂O₇ foi

estatisticamente inferior ao extraído com NaOH, de 3,2% e 5,1%, respectivamente (DICK et al., 1998). Os resultados acima confirmam os evidenciados nesse estudo, que ao utilizar NaOH como solução extratora (método III) obteve valores entre 6,72 e 9,43% e, para Na₄P₂O₇, os valores foram de 1,18 a 2,46%.

Os teores de N obtidos de vinte e seis amostras de AHs extraídos de superfícies de solos virgens coletados no Japão, utilizando pirofosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ (Na₄P₂O₇) e NaOH 0,1 mol L⁻¹ como solução extratora, ficaram entre 1,86 e 4,77%. No presente trabalho, fazendo uso da mesma solução (pirofosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ + NaOH 0,1 mol L⁻¹) (método II) para extração de AHs de LE, foram encontrados teores de N entre 1,18 e 2,46% (KATSUMI et al., 2015).

Verificando os valores de δ¹³C dos três AHs avaliados pelos três métodos, foi possível observar que o AH oriundo do LE2 apresentou valores superiores em relação aos demais, sendo -19,90‰, -20,81‰ e -21,23‰ para os métodos I, II e III, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo na abundância natural de δ¹³C (‰) contido nos ácidos húmicos extraídos

MÉTODOS	TIPOS DE LODO		
	1	2	3
	----- δ ¹³ C nos AHs -----		
I	-24,76cA	-19,90aA	-23,09bA
II	-25,16bA	-21,23aB	-24,58bB
III	-25,83bB	-20,81aB	-25,57bC
DMS (1%)		0,63	
CV (%)		-1,00	
F Met. X Tipos de lodo		15,00**	

Tipos de lodo: 1 - LE estabilizado, 2 - LE compostado com bagaço de cana e 3 - LE in natura. Métodos: I (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS)), II (Instrução Normativa SDA nº 28 (MAPA, BRASIL, 2007) e III (Comunicado Técnico nº 16 (MAPA, Benites et al., 2003)). * indica diferença a 5% e ** indica a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e ns = não significativo a (p>0,01 ou a 0,05). Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si.

Uma possível hipótese para os resultados encontrados para o AH a partir do LE2, é a composição do LE utilizado como matéria-prima para extração, pois trata-se de uma mistura de LE + bagaço de cana na proporção de 1:1, ou seja, uma parte de lodo para uma parte de bagaço de cana.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp), pertence ao grupo de plantas com metabolismo fotossintético C₄, que fixam CO₂ atmosférico por meio da enzima (PEP carboxilase), que apresenta elevada afinidade pelo CO₂ (MAGALHÃES, 1985; CORSI; NASCIMENTO JR, 1986). No entanto, as plantas com metabolismo fotossintético C₃, fixam o CO₂ atmosférico através da enzima (RubisCO), a qual apresenta menor afinidade pelo CO₂ e faz com que ela discrimine o isótopo de carbono pesado ¹³C em relação ao isótopo leve ¹²C, muito mais do que a PEP carboxilase, gerando menos acúmulo de ¹³C (SMITH; EPSTEIN, 1971).

O fato da enzima (PEP carboxilase) discriminar menos o ¹³C nas plantas de ciclo C₄, faz com que essas plantas apresentem valores de abundância isotópica entre -9 a -16‰, ao contrário de plantas C₃, que os valores variam entre -22 a -34‰, gerando uma variação média de 14‰ (VOGEL 1993; BOUTTON, 1996; DUCATTI et al., 2011). Em razão disso, é possível identificar os ciclos fotossintéticos das plantas com base na análise da variação da abundância isotópica de ¹³C (ALVES et al., 2006; DUCATTI et al., 2011). Mediante o exposto, são plausíveis os resultados observados da δ¹³C para o AH2 apresentarem valores entre -19,90 a -21,23‰.

Para os AHs oriundos dos LE1 e LE3 não foi possível relacionar sua assinatura isotópica a nenhuma outra assinatura já conhecida, por não ter sido introduzido ao material de origem nenhuma fonte de carbono, como foi feito no LE2. De acordo com Caxito; Silva, (2015), os AHs oriundos dos LE1 e LE3 referem-se a amostras enriquecidas nos isótopos leves ¹²C, em virtude dos valores encontrados de δ serem mais negativos. E, o AH a partir do LE2, é uma amostra enriquecida no isótopo pesado, pois apresentou valores menos negativos de δ, em relação ao padrão utilizado.

Ao avaliar as amostras de AHs extraídos de diferentes LE (1,2 e 3) para a δ¹⁵N, constatou-se diferença significativa para as três amostras. Para o LE1 obtiveram-se valores significativamente maiores da δ¹⁵N (3,06 a 4,66‰), em relação ao LE2 e LE3 para ambos os métodos. Foi possível verificar diferença significativa entre o LE2 e LE3, em ambos os métodos, com valores de 2,02 a 2,69‰ e 0,64 a 1,77‰, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - Interação entre métodos de extração e tipos de lodo na abundância natural de $\delta^{15}\text{N}$ (‰) contido nos ácidos húmicos extraídos

MÉTODOS	TIPOS DE LODO		
	1	2	3
	----- $\delta^{15}\text{N}$ nos AHs -----		
I	4,66aA	2,69bA	0,64cC
II	4,62aA	2,02bB	1,31cB
III	3,06aB	2,29bB	1,77cA
DMS (1%)		0,33	
CV (%)		4,89	
F Met. X Tipos de lodo		111,79**	

Tipos de Lodo: 1 - LE estabilizado, 2 - LE compostado com bagaço de cana e 3 - LE in natura. Métodos: I (Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS), II (Instrução Normativa SDA nº 28 (MAPA, BRASIL, 2007) e III (Comunicado Técnico nº 16 (MAPA, Benites et al., 2003). * indica diferença a 5% e ** indica a 1% de probabilidade pelo teste de Tukey e ns = não significativo a ($p > 0,01$ ou a $0,05$). Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si.

Uma possível justificativa para as diferenças observadas nos valores das razões isotópicas de ^{15}N dos AHs é a composição e o processo de compostagem pelos quais alguns lodos foram submetidos. Para que ocorra a decomposição ideal do resíduo orgânico é necessário que a relação do conteúdo de carbono e nitrogênio (C/N) esteja adequada, ou seja, de 30:1 (MARRIEL et al., 1987), pois a concentração de C e N está diretamente relacionada ao crescimento e à diversidade dos microrganismos, fornecendo nutrientes para a síntese protoplasmática e a energia suficiente para o crescimento celular (TROMBIN et al, 2005).

No caso do AH a partir do LE1, foi utilizado como matéria-prima para extração o LE estabilizado, que passou pelo processo de bioxidação aeróbia microbiana, transformando a matéria orgânica não estabilizada em um composto estabilizado (KIEHL, 2004; BUDZIAK et al., 2004; GARG et al., 2006; ANDREOLI et al., 2014), o qual apresentou uma baixa relação C/N de 7:1.

Segundo Kiehl, (1998), quando a relação C/N encontra-se baixa, os microrganismos eliminam o excesso de N (forma amoniacal), acarretando perdas do elemento no material orgânico em decomposição até alcançar a relação C/N de 30:1, e em seguida, a relação diminuirá até atingir valores de 12:1 a 10:1 (material orgânico humificado) no final do processo de decomposição.

Essa perda de N na forma de amônia por volatilização durante o processo de compostagem, acarreta a diminuição das concentrações de N no material (BERTOLDI et al., 1983), com isso, ocorre um enriquecimento de ^{15}N (pesado) em relação ao ^{14}N (leve), o que resulta em valores elevados para razão isotópica.

Diante do exposto, justificam-se os valores encontrados para o AH a partir do LE1 em relação aos demais materiais no presente estudo. Os valores encontrados da razão isotópica de ^{15}N para o AH a partir de LE2, foram significativamente inferiores aos encontrados a partir do LE1, sendo 2,69, 2,02 e 2,29‰, para os métodos I, II e III, respectivamente. A hipótese para essa diferença pode estar relacionada à composição do material utilizado como matéria-prima, a qual consiste em uma mistura de LE + bagaço de cana, na proporção de 1:1.

O material (LE + bagaço de cana) apresentou, antes de iniciar o processo de compostagem, o valor para relação C/N de 36:1 (CRUZ, 2019), estando próximo à variação indicada por Kiehl, (2001) de 25 a 35:1, sendo a recomendada como ideal 30:1. Essa relação é favorável ao metabolismo dos microrganismos heterotróficos que efetuarão a decomposição do material, os quais necessitam de N para síntese de proteína e de C como fonte de energia (COTTA et al., 2015).

Durante a decomposição, a relação C/N tende a baixar e a matéria orgânica ser humificada, com isso a relação C/N alcança valores de aproximadamente 10/1 (KIEHL, 1998). A diferença durante o processo de compostagem realizada para o AH, a partir do LE1 em relação ao LE2, foi a perda de N (forma amoniacal) por volatilização durante o processo. Pois, no decorrer do processo de compostagem do LE2, quase todo o N presente no material é utilizado pelos microrganismos, com isso, não ocorre a perda de N por volatilização e nem a concentração do ^{15}N no composto, gerando assim valores mais baixos para a razão.

No caso do AH a partir do LE3, este apresentou valores significativamente menores da razão isotópica de ^{15}N em relação aos outros dois AHs, de 0,64, 1,31 e 1,77‰, para os métodos I, II e III, respectivamente. Uma hipótese para explicar os resultados encontrados para esse material, pode ser a característica do lodo, ou seja, recém-saído da centrifuga com aproximadamente 85% umidade sem ter sido submetido a nenhum processo de compostagem.

1.4 CONCLUSÃO

Ao final das avaliações, o método III foi escolhido para a realização das posteriores extrações, pois apresentou maior rendimento total dos AHs extraídos.

O método I destacou-se na concentração de carbono, hidrogênio e nitrogênio nos AHs, quando comparado aos métodos II e III, porém com baixíssimo rendimento e, conseqüentemente, não seria viável para as extrações a serem realizadas no decorrer do trabalho.

Em relação aos lodos de esgoto utilizados, o lodo 3 destacou-se dos demais para as concentrações de carbono, hidrogênio e nitrogênio em ambos os métodos, sendo então o mesmo selecionado para posteriores extrações.

REFERÊNCIAS

- AL-FAIYZ, Y. S. S. CPMAS ¹³C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. **Arabian J. Chem.** 10:S 839–S853, 2017.
- ALVES, B. J. R.; ZOTARELLI, L.; JANTALIA, C. P.; BODDEY, R. M.; URQUIAGA, S. **Emprego de Isótopos Estáveis para o Estudo do Carbono e do Nitrogênio no Sistema Solo-Planta.** Miolo Biota. pmd cap. 13, pag. 343-368, 2006.
- ANDREOLI, C. V.; VON SPERLING, M.; FERNANDES, F. **Lodo de esgoto: tratamento e disposição final.** 2.ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 444 p, 2014.
- ASING, J.; WONG, N.C.; LAU, S. Optimization of extraction method and characterization of humic acid derived from coals and composts. **J. Trop. Agric. and Fd. Sc.** 37(2), 211–223, 2009.
- AUBAIN, P.; GAZZO, A.; MOUX, J.L.; MUGNIER, E.; BRUNET, H.; LANDREA, B. Disposal and Recycling Routes for Sewage Sludge. **European Commission DG Environment**, 1– 25, 2002.
- BARBOSA, J. C; MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat - sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos.** Jaboticabal – SP, FCAV/UNESP. 396p, 2015.
- BENITES, V. M.; MADARI, B.; MACHADO, P. L. O. A. **Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo:** um procedimento simplificado de baixo custo. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2003. 7 p. (Comunicado Técnico, 16).
- BERTOLDI, M.; VALLINI, G.; PERA, A. The biology of composting: a review. **Waste Management & Research**, Áustria, v. 1, n. 2, p. 157-176, 1983.
- BOUTTON, T.W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOOTTON, T.W.; YAMASAKI, S-I. (Eds.) **Mass spectrometry of soils.** New York: Marcel Dekker, p.47-82, 1996.
- BRASIL, Instrução Normativa nº 28 de 27 de julho de 2007, Aprovar os Métodos Analíticos Oficiais para Fertilizantes Minerais, Orgânicos, Organo-Minerais e Corretivos, disponíveis na Coordenação-Geral de Apoio Laboratorial - CGAL/SDA/MAPA, na Biblioteca Nacional de Agricultura – BINAGRI e no sítio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento na rede mundial de computadores, endereço eletrônico: www.agricultura.gov.br. Brasília, Brasil, 2007.
- BRONICK, C. J.; LAL, R. Soil structure and management: a review. **Geoderma** 124:3–22, 2005.
- BUDZIAK, C. R.; MAIA, C. M. B. F.; MANGRICH, A. S.. Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. **Química Nova** [online]. 2004, vol.27, n.3, pp.399-403, 2004.

CAXITO, F. A.; SILVA, A. V. Isótopos estáveis: fundamentos e técnicas aplicadas à caracterização e proveniência geográfica de produtos alimentícios. **Geonomos**, 23(1), 10-17, 2015.

CONSELVAN, G. B.; FUENTES, D.; MERCHANT, A.; PEGGION, C.; FRANCIOSO, O., CARLETTI, P. Effects of humic substances and indole-3-acetic acid on Arabidopsis sugar and amino acid metabolic profile. **Plant Soil**. 426:17–32, 2018.

CORSI, M.; NASCIMENTO JUNIOR, D. Princípios de fisiologia e morfologia de plantas forrageiras aplicadas no manejo das pastagens. In: PEIXOTO, A.M.; MOURA, J.C. de FARIA, V.P. de (eds.). **Pastagens: fundamentos da exploração racional**. Piracicaba. FEALQ, p. 11-37, 1986.

COTTA, J. A. O.; CARVALHO, N. L. C.; BRUM, T. S.; REZENDE, M. O. O. Compostagem *versus* vermicompostagem: comparação das técnicas utilizando resíduos vegetais, esterco bovino e serragem. **Eng Sanit Ambient** | v.20 n.1, 65-78, 2015.

CRUZ, C. V. **Produção e eficiência agrônômica de fertilizantes organominerais a partir de lodo de esgoto enriquecido com fosfatos**. 2019. 68 p. Tese (Doutorado em Agronomia - Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP.

DAS, T.; SAIKIA, B.K.; BARUAH, B.P.; DAS, D. Characterizations of Humic Acid Isolated from Coals of Two Nagaland Coalfields of India in Relation to their Origin. **Jour. Geol. Soc.** Índia, v.86, pp.468-474, 2015.

DICK, D.P.; GOMES, J.; ROSINHA, P.B. Caracterização de substâncias húmicas extraídas de solos e de lodo orgânico. **Revista. Bras. C. Solo**, 22:603-611, 1998.

DOSKOČIL, L.; BURDÍKOVÁ-SZEWIECZKOVÁ, J.; ENEV, V.; KALINA, L.; WASSERBAUER, J. Spectral characterization and comparison of humic acids isolated from some European lignites. **Fuel** 213, 123–132, 2018.

DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. B.; MARTINS, M. B.; VIEIRA JÚNIOR, L. C.; DENADAI, J. C. Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. **Revista Bras. Zootec.**, v.40, p.68-75, 2011.

FRANCIOSO, O.; SÁNCHEZ-CORTÉS, S.; TUGNOLI, V.; CIAVATTA, C.; GESSA, C. Characterization of peat fulvic acid fractions by means of FT-IR, SERS and ¹H, ¹³C NMR spectroscopy. **Appl. Spectrosc.** 55:270–277, 1998.

GARG, P.; GUPTA, A.; SATYA, S. Vermicomposting of different types of waste using *Eisenia foetida*: A comparative study. **Bioresource technology**, 97(3), 391-395, 2006.

GUSIATIN, Z. M.; KULIKOWSKA, D.; KLIK, B. Suitability of humic substances recovered from sewage sludge to remedy soils from a former as mining area – a novel approach. **Jour Hazard Mater.**, v.338, pp.160-166, 2017.

HERNANEZ-APAOLAZA, L.; GASCO, J. M.; GUERRERO, F. Initial organic matter transformation of soil amended with composted sewage sludge. **Biol. Fertil. Soils** 32, 421–426, 2000.

KATSUMI, N.; YONEBAYASHI, K.; FUJITAKE, N.; OKAZAKI, M. Relationship between stable carbon and nitrogen isotope ratios of humic acids extracted from Andisols and non-Andisols. **Catena** 127, 214–221, 2015.

KIEHL, C. J. Produção de composto orgânico e vermicomposto. **Informe Agropecuário**, v.22, n.212, p.40-42, 47-52, Belo Horizonte, 2001.

KIEHL, E. J. Papel dos microrganismos na compostagem. **Revista Ação Ambiental**, v.1, n.1, p.17-20, 1998.

KIEHL, E.J. **Manual de compostagem: maturação e qualidade do composto**. 4. ed. Piracicaba: E. J. KIEL. 173 p, 2004.

KUMARI, M.; GHOSH, P.; THAKUR, I. S. Landfill leachate treatment using bacto-algal co-culture: An integrated approach using chemical analyses and toxicological assessment. **Ecotoxicol. Environ. Safe**. 128, 44–51, 2016.

KUWATSUKA, S.; WATANABE, A.; ITOH, K.; ARAI, S. Comparison of Two Methods of Preparation of Humic and Fulvic Acids, IHSS Method and NAGOYA Method. **Soil Science and Plant Nutrition**, 38 (1), 23-30, 1992.

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

MAGALHÃES, A.C.N. Fotossíntese. In: FERRI, M.G. (coord.). **Fisiologia vegetal 1**. São Paulo: EPU, p. 117-166, 1985.

MARRIEL, I. E., KONZEN, E. A., ALVARENGA, R. C., SANTOS, H. L. Tratamento e utilização de resíduos orgânicos. **Informe Agropecuário**, v.13, n.147, p. 24-36, 1987.

MOROZESK, M.; BONOMO, M.M.; SOUZA, L.C.; ROCHA, L.D.; DUARTE, I.D.; MARTINS, I.O.; DOBSS, L.B.; CARNEIRO, M.T.W.D.; FERNANDES, M.N.; MATSUMOTO, S.T. Effects of humic acids from landfill leachate on plants: an integrated approach using chemical, biochemical and cytogenetic analysis. **Chemosphere**, v.184, pp.309-317, 2017.

NARDI, S.; CARLETTI, P.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A. Biological activities of humic substances. In: Huang PM, Senesi N (eds). **Biophysico-chemical processes in environmental systems**. Wiley, Hoboken, 2009.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biol Biochem** 34:1527–1536, 2002.

ROSA, A. H.; ROCHA, J. C.; FURLAN, M. Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam no processo de extração alcalina. **Química Nova**, 23(4), 2000.

SHAHBAZI, K.; MARZI, M.; TABBAKHIAN, S. The Comparative Evaluation of Humic Acid determining Methods in Humic-Based Commercial Fertilizers. **Archives of Agronomy and Soil Science**, pg 1 – 31, 2019.

SMITH, B. N.; EPSTEIN, S. Two categories of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios for higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 47, p. 380-384, 1971.

SUTZKOVER-GUTMAN, I.; HASSON, D.; SEMIAT, R. Humic substances fouling in ultrafiltration processes. **Desalination**. 261(3):218-231, 2010.

SWIFT, R.S. Organic matter characterization. In: SPARKS, D. et al. **Methods of soil analysis: Chemical methods**. Soil Science Society America, 1996. Part 3. p.1018-1020. (Soil Science Society of America, Serie, 5).

TROMBIN, D.F.; VIANA, E.; RÉUS, G. Z.; BALLMANN, C. **A relação C/N dos resíduos sólidos orgânicos do bairro universitário da cidade de Criciúma – SC**. In: XXV Encontro Nac. de Eng. de Produção – Porto Alegre/RS, 2005.

VOGEL, J.C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J.R.; HALL, A.E.; FARQUHAR, G.D. (Eds.). **Stable isotopes and plant carbon: water relations**. San Diego: Academic Press, p.29-46, 1993.

WU, J.; ZHAO, Y.; QIA, H.; ZHAO, X.; YANG, T.; DU, Y.; ZHANG, H.; WEIA, Z. Identifying the key factors that affect the formation of humic substance during different materials composting. **Bioresource Technol**. 2017.

ZARA, M.; AHMAD, Z.; AKHTAR, J.; SHAHZAD, K.; SHEIKH, N.; MUNIR, S. Extraction and characterization of humic acid from Pakistani lignite coals, **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**, 1- 8, 2017.

CAPÍTULO 2

DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDO A PARTIR DE LODO DE ESGOTO NO CULTIVO DE ALFACE

RESUMO

A utilização de ácidos húmicos na agricultura é promissora devido à capacidade dessa fração da matéria orgânica promover alterações no crescimento e desenvolvimento de plantas. Neste sentido, teve-se como objetivo avaliar as respostas de plantas de alface à aplicação de doses de AH extraído a partir de LE. O experimento foi realizado em ambiente protegido e em dois ciclos (inverno e primavera). O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, esquema fatorial 2 x 6, sendo duas fontes: AH extraído a partir de lodo de esgoto “in natura” e AH comercial e seis doses, com quatro repetições e três plantas por parcela. As doses utilizadas foram de 0, 0,5, 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹. Após a colheita foram realizadas as seguintes avaliações: biométricas (diâmetro e comprimento do caule; diâmetro, altura e número de folhas da planta; massa fresca e seca da parte aérea); volume radicular; análise química da parte aérea; teores de pigmentos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) e índice indireto de clorofila (SPAD). Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de comparação de médias (Tukey a $p \leq 0,05$) e quando significativos foram realizados estudos de regressão. O AH extraído a partir de LE proporcionou incremento na massa fresca, massa seca e diâmetro do caule em resposta as menores doses e aumento no volume radicular quando utilizado a fonte de AH comercial. Os teores de K, Ca, Mg, B e Mn nas plantas de alface foram aumentados em função da utilização de AH extraído a partir de lodo de esgoto, já para a fonte de AH comercial foi verificado aumento nos teores de Mn e K e decréscimo para os teores de Ca, Fe e B.

Palavras-chave: bioestimulante; nutrição de plantas; substâncias húmicas; *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

The use of humic acids in agriculture is promising due to the ability of this fraction of organic matter to promote changes in plant growth and development. In this sense, the objective was to evaluate the responses of lettuce plants to the application of doses of HA extracted from LE. The experiment was carried out in a protected environment and in two cycles (winter and spring). The experimental design used was in randomized blocks, factorial scheme 2 x 6, with two sources: HA extracted from sewage sludge "in natura" and commercial HA and six doses, with four replications and three plants per plot. The doses used were 0, 0.5, 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0 mM of C L⁻¹. After harvesting, the following evaluations were performed: biometric (diameter and length of the stem; diameter, height, and number of leaves of the plant; fresh and dry mass of the aerial part); root volume; aerial part chemical analysis; pigment contents (chlorophyll *a*, *b* and carotenoids) and indirect chlorophyll index (SPAD). Data were submitted to analysis of variance by means of comparison test (Tukey at $p \leq 0.05$) and regression studies were performed when significant. The HA extracted from LE provided an increase in fresh mass, dry mass, and stem diameter in response to lower doses and an increase in root volume when using the commercial HA source. The levels of K, Ca, Mg, B and Mn in the lettuce plants were increased due to the use of HA extracted from sewage sludge, while for the commercial HA source, an increase in the levels of Mn and K and a decrease for Ca, Fe and B contents.

Keywords: biostimulant; plant nutrition; humic substances; *Lactuca sativa*.

2.1 INTRODUÇÃO

Os solos tropicais têm a matéria orgânica (MOS) como um dos principais componentes responsáveis pela manutenção da sua qualidade e fertilidade, as quais estão diretamente relacionadas à produtividade e sustentabilidade de sistemas de produção agrícola. Cerca de 10 a 15% da reserva total de carbono orgânico (CO) nos solos minerais é formada por macromoléculas (proteínas e aminoácidos, carboidratos simples e complexos, resinas, ligninas e outras) e 85 a 90% são constituídas pelas substâncias húmicas (SHs) (ZECH et al., 1997), estabelecendo um sistema heterogêneo complexo de compostos orgânicos, diferindo-se pela composição, função e grau de acessibilidade à microbiota do solo (CHRISTENSEN, 2000).

As SHs são divididas em três principais frações químicas: ácidos fúlvicos (AF), ácidos húmicos (AH) e humina (HUM), as quais são determinadas com base na solubilidade em meio ácido ou alcalino (STEVEYSON, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Algumas características relatadas sobre as SHs estão relacionadas com sua afinidade com as propriedades físico-químicas dos solos, a interação com metais e compostos orgânicos, a promoção do crescimento e o poder de induzir alterações no metabolismo primário e secundário das plantas ligado à tolerância ao estresse (CANELLAS; OLIVARES, 2014; CANELLAS et al., 2015).

A aplicação exógena de SHs nos sistemas agrônômicos pode ser administrada como auxílio no desenvolvimento sustentável. Atualmente a maioria das SHs utilizadas na agricultura é derivada de recursos não renováveis, como turfa e carvão; e com o aumento do uso dessas substâncias surge a necessidade de busca por fontes sustentáveis de produtos húmicos, por exemplo, resíduos orgânicos (CANELLAS et al., 2015).

Com o intuito de buscar novas fontes para a extração de SHs, vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos utilizando materiais como carvões de baixa qualidade e seus resíduos, solos, resíduos de culturas agrícolas, compostos orgânicos, lixiviado de aterro sanitário, resíduos animais e lodo de esgoto (DAS, et al., 2015; AL-FAIYZ, 2017; GUSIATIN et al., 2017; MOROZESK et al., 2017; WU et al., 2017).

O lodo de esgoto (LE) apresenta grande potencial para ser utilizado como matéria-prima na obtenção das frações húmicas, por conta dos altos teores de matéria orgânica em sua composição (BETTIOL e CAMARGO, 2006; LIMA et al., 2011), fato esse que possibilita sua reciclagem por meio da extração de SHs, sendo a fração AH

a mais bioativa em vegetais (ADANI et al., 2010; CANELLAS et al., 2012; CHAI et al., 2013).

Os AHs são caracterizados por apresentar baixo peso molecular e a bioatividade dessa fração deriva da sua estrutura química e do seu peso molecular, os quais são responsáveis pelo crescimento vegetal e realização de ligações iônicas (JANNIN et al., 2012). As propriedades dos AHs podem favorecer um rápido desenvolvimento e aumento na produtividade das plantas, proporcionando redução de custos com adubação e o tempo de produção (VERLINDEN et al., 2009; LIMA et al., 2011). Podem também influenciar processos fisiológicos, o crescimento das plantas e a absorção de nutrientes (CONSELVAN et al., 2018).

Apesar da influência positiva da fração húmica relatada na literatura, as respostas das plantas à aplicação dessa substância não são análogas, variando de acordo com a matéria-prima das quais esses compostos são extraídos, a sua concentração e o genótipo da planta (BALDOTTO et al., 2012), mostrando-se necessário avaliar as respostas das mesmas aos AHs de diferentes fontes e suas concentrações. Neste sentido, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a resposta de plantas de alface à aplicação de AH extraído a partir de LE em diferentes concentrações.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Localização e caracterização da área experimental

O experimento foi realizado em ambiente protegido na área experimental do Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, em Botucatu-SP, em dois ciclos (inverno e primavera). A estrutura protegida utilizada foi do tipo arco com 7,0 m de largura e 25 m de comprimento, com altura do pé direito de 3,0 m, coberta com plástico anti-UV e com janelas superiores (abertas pela manhã e fechadas ao final da tarde). Para a ambientação ideal dentro da estufa, controlando a temperatura e luminosidade interna, fez-se uso de tela termo refletora com 35% de refletância, instalada horizontalmente na altura do pé direito, a qual era manejada por um sistema de roldanas.

2.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, esquema fatorial 2 x 6, sendo avaliadas duas fontes de AH (ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto “in natura” e (ácido húmico comercial) e seis doses, em quatro repetições. As doses utilizadas foram definidas com base nas relatadas na literatura por Canellas et al. (2010) e em função da concentração de carbono presente nos materiais (0, 0,5, 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹).

Cada parcela foi constituída por três vasos, contendo uma planta cada. Os vasos utilizados no experimento tinham capacidade de 1,3 litros, com coloração cinza marmorizado, os quais foram preenchidos com 1 litro de solo em cada.

2.2.3 Clima

De acordo com a classificação de Koppen, o clima da região é Cfa, clima temperado quente (mesotérmico) úmido, e a temperatura mais quente do ano superior a 22°C (CUNHA; MARTINS, 2009). Nas figuras 1 e 2 são apresentados os dados diários de temperatura média do ar e umidade relativa média ocorridos durante o primeiro e o segundo ciclos experimentais, respectivamente. Estes foram obtidos a partir de leituras realizadas com o auxílio de um termohigrômetro modelo HT-500, que registrava os dados a cada uma hora.

Figura 1 - Temperatura média do ar e umidade relativa média durante o 1º ciclo com 44 dias (inverno: 30/06/2020 a 12/08/2020)

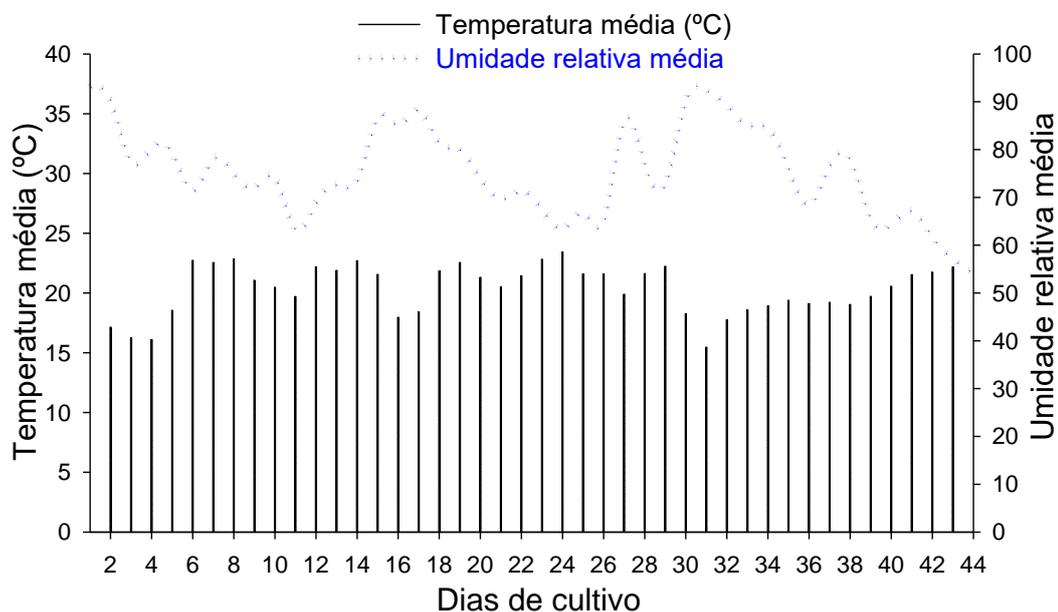
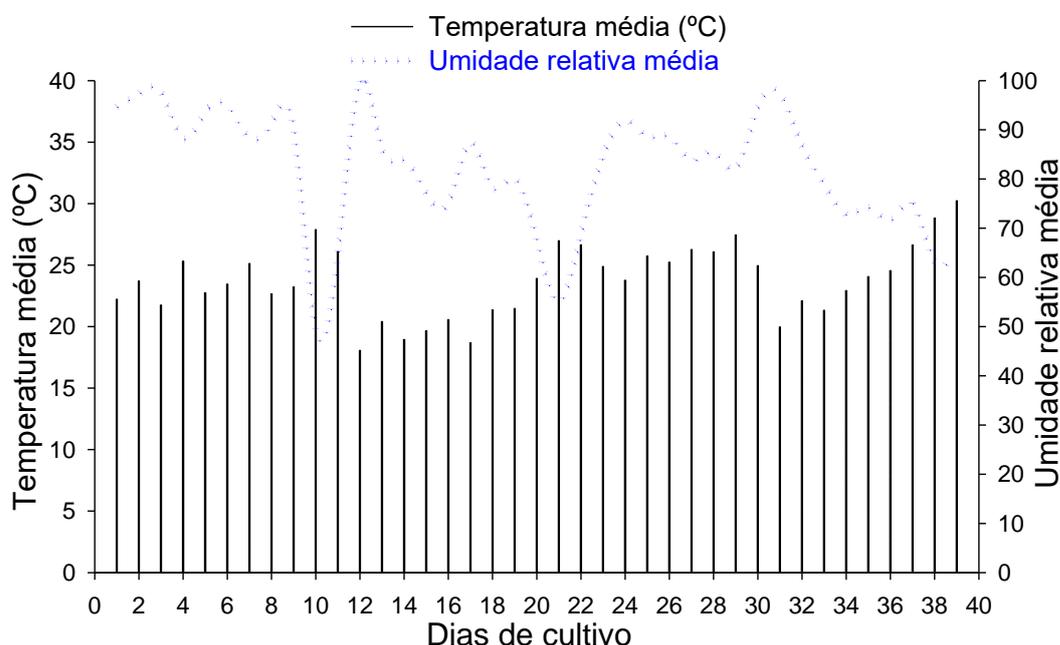


Figura 2 - Temperatura média do ar e umidade relativa média durante o 2º ciclo com 39 dias (primavera: 16/10/2020 a 23/11/2020)



2.2.4 Solo

Os atributos químicos do solo (Tabela 1) foram avaliados antes da instalação do experimento, sendo coletadas 4 subamostras que foram homogeneizadas, dando origem a uma única amostra. A análise química foi realizada no Laboratório de Fertilidade do Solo do Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente da Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA/UNESP, em Botucatu-SP, segundo a metodologia adaptada de Raij et al. (2001).

Tabela 1 - Análise química do solo utilizado no experimento

pH	M.O.	P(resina)	Al ³⁺	H+Al	K	Ca	Mg	SB	CTC	V	S
CaCl ₂	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	----- mmol _c dm ⁻³ -----							%	mg dm ⁻³
4,3	16	4	4	30	0,4	5	1	6	36	16	17
	B		Cu		Fe			Mn		Zn	
	----- mg dm ³ -----										
	0,2		0,8		25			0,1		0,2	

2.2.5 Caracterização dos tratamentos

Foram utilizados dois tipos de ácido húmico, o extraído a partir de lodo de esgoto “in natura”, utilizando-se o método descrito no Comunicado Técnico nº 16 (MAPA) e a fonte de ácido húmico comercial (K-humate).

Para caracterizar o AH extraído foi realizada uma análise através do analisador elementar automático (*Perkin Elmer*. Modelo: EA 2400 Series II) para caracterizar os elementos: fósforo (P), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), sódio (Na), carbono (C), hidrogênio (H), nitrogênio (N), boro (B), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) (Tabela 2).

Tabela 2 - Análise química do ácido húmico extraído de lodo de esgoto in natura

pH	P	Ca	Mg	S	Na	C	H	N
CaCl ₂		----- g kg ⁻¹ -----				----- % -----		
8,6	2,2	11	2,5	4	6	24	3	2
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	CE		
	----- mg kg ⁻¹ -----					mS/cm		
	75	483	25999	229	963	1,5		

O produto comercial k-humate® foi utilizado como fonte de ácido húmico, e suas principais características foram obtidas na bula comercial: fertilizante líquido organomineral Classe A, fonte concentrada de ácidos húmicos e fúlvicos, derivados de Leonardita Australiana (mundialmente reconhecida como a fonte mais concentrada); alta capacidade de troca de cátions (CTC); 100% solúvel em água e alta estabilidade e reatividade no solo. Segundo informações da empresa fabricante, o produto favorece o desenvolvimento radicular e melhora o aproveitamento dos fertilizantes pelas plantas, promovendo maior produtividade. Os níveis de garantia do produto foram especificados no rótulo (Tabela 3).

Tabela 3 - Níveis de garantia do produto comercial utilizado no experimento

pH	K ₂ O	COT	AH	AF	Índice salino	CE
	----- % p/p -----					mS/cm
11	4,8	12	18	3	10	0,64

2.2.6 Características do material vegetal utilizado no experimento

A cultura utilizada no experimento foi a alface (*Lactuca sativa*) var. Vera, disponibilizada pela empresa Sakata Seed. A variedade Vera tem uma alta qualidade visual em termos de tamanho e crespicidade, facilidade de comercialização por ser

referência em termos de qualidade visual (folhas crespas), são plantas de porte grande, folhas largas e com alta crespicidade, com ciclo médio total de aproximadamente 60 dias e apresenta alto nível de resistência ao pendoamento precoce.

2.2.7 Irrigação e adubação

A irrigação foi realizada manualmente, mantendo-se o solo umedecido a 80% da capacidade de campo. Para saber a quantidade de água necessária para o manejo de irrigação, foi realizada a pesagem diária de 48 vasos com o auxílio de uma balança, obtendo-se então uma média da quantidade de água necessária, sendo esse processo realizado duas vezes por dia. O controle de pragas e doenças foi realizado quando necessário durante o ciclo. A adubação de plantio foi realizada conforme exigência da cultura e análise de solo, e durante o ciclo foram realizadas três adubações de cobertura com nitrato de amônio e cloreto de potássio.

2.2.8 Avaliações

2.2.8.1 Análises biométricas

Diâmetro e comprimento do caule; diâmetro, altura e número de folhas da planta

Após a colheita foram realizadas as medidas de diâmetro e comprimento do caule com a utilização de paquímetro. O diâmetro e altura da planta foram verificados com o auxílio de trena. Logo após, com auxílio de um estilete, foram separadas todas as folhas de cada planta e estas foram contadas. As avaliações foram realizadas com 2 plantas de cada parcela.

Massa fresca e seca da parte aérea

Para a avaliação da massa fresca da parte aérea foi separada a parte aérea da raiz e com o auxílio de uma balança digital graduada em 0,001 g, foi pesado o material vegetal total de 2 plantas de cada parcela. Após a pesagem da matéria fresca da parte aérea, as amostras foram mantidas em estufa com temperatura a 65°C com circulação de ar forçada até a estabilização da massa e posterior a isso foi realizada a pesagem da massa seca.

2.2.8.2 Volume radicular

Para determinar o volume radicular (cm^3) as raízes foram separadas da parte aérea, lavadas em água corrente até a retirada do máximo de solo e substrato possível. A determinação foi realizada por meio da medição do deslocamento da coluna de água em proveta graduada, ou seja, colocou-se as raízes em proveta contendo um volume conhecido de água (150 mL). Pela diferença, obteve-se a resposta direta do volume radicular, pela equivalência de unidades ($1 \text{ mL} = 1 \text{ cm}^3$), segundo metodologia descrita por Basso (1999).

2.2.8.3 Análise química da parte aérea

No final do ciclo da cultura, as plantas foram colhidas e separadas em parte aérea e raiz. Em seguida os materiais foram lavados em água corrente, depois em água deionizada e, acondicionados em sacos de papel, sendo secos em estufa de circulação forçada de ar a $65 \text{ }^\circ\text{C}$, até a estabilização da massa. Após secos, os materiais foram moídos em moinho do tipo Willey para a determinação dos seguintes nutrientes: nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco, conforme a metodologia de Malavolta et al. (1997), no Laboratório do Departamento de Solos e Recursos Ambientais – FCA/UNESP, em Botucatu-SP.

2.2.8.4 Teores de pigmentos fotossintéticos

As extrações dos teores de pigmentos foram realizadas aos 38 e 41 dias após transplante para o 1º e 2º ciclo, respectivamente. Foram utilizados 2 discos foliares frescos com $0,69 \text{ cm}^2$ de diâmetro cada. Os discos foram mantidos em tubos de ensaio contendo 1 ml de dimetilformamida (DMF) por 24 h no escuro. O extrato contendo clorofilas solubilizadas foi analisado em espectrofotômetro a $\lambda = 649 \text{ nm}$ (clorofila a), 665 nm (clorofila b) e 470 nm (carotenoides). A partir dos valores de absorbância determinados, os teores de clorofilas a e b e carotenoides foram calculados a partir das equações descritas por Lee et al., (1987) e expressos em $\mu\text{g cm}^{-2}$.

$$CloA=(12\times C)-(3,11\times B)$$

Onde: CloA – Clorofila a;

C – Leitura da amostra a $663,8\text{nm}$;

B - Leitura da amostra a $646,8\text{nm}$;

$$CloB=(20,78\times C)-(4,88\times B)$$

Onde: CloB - Clorofila b;

C – Leitura da amostra a 663,8nm;

B - Leitura da amostra a 646,8nm.

$$CarT=((1000\times A)-(1,12\times cloA)-(34,07\times CloB)245)$$

Onde: CarT – carotenoides totais;

A - Leitura da amostra a 480nm;

CloA – Clorofila a;

CloB - Clorofila b.

2.2.8.5 Índice indireto de clorofila

Foram realizadas medições indiretas de clorofila aos 35 e 28 dias após transplante para o 1º e 2º ciclo, respectivamente. As medidas foram realizadas utilizando-se um medidor eletrônico portátil de intensidade da cor verde das plantas (SPAD), modelo Digital SPAD 502 (MINOLTA). As verificações foram realizadas em 2 pontos da folha (completamente expandida), nas 3 plantas de cada parcela.

2.2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de comparação de médias (Tukey a $p \leq 0,05$) e quando significativos foram realizados estudos de regressão. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico Agroestat (Barbosa; Maldonado Júnior, 2015) e os resultados significativos para doses foram apresentados na forma gráfica, com o auxílio do programa SigmaPlot 12.5.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, pode-se observar que não houve diferença significativa dos tratamentos utilizados para os teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides em ambos os ciclos (Tabela 4).

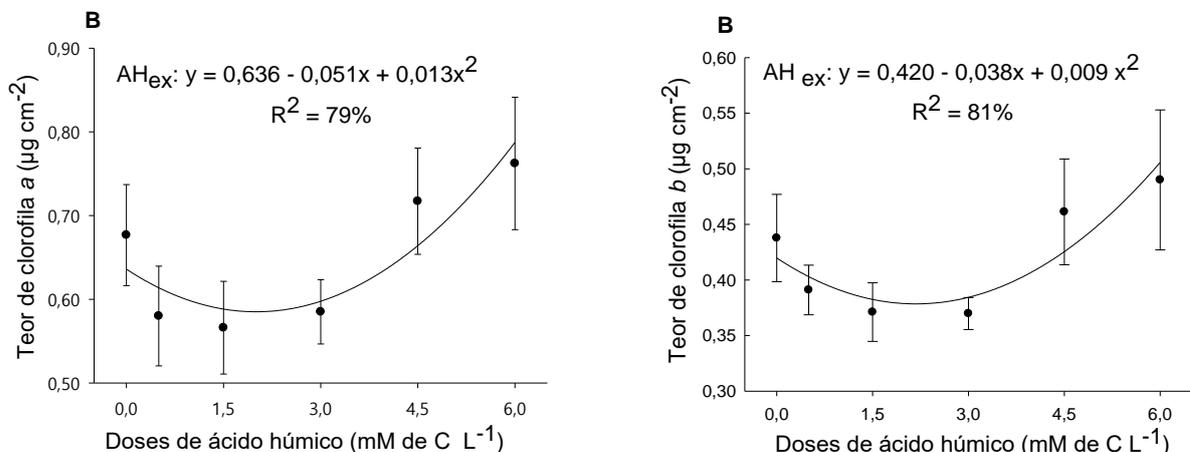
Tabela 4 – Teor de clorofila a, b e carotenoides em plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	Clorofila a		Clorofila b		Carotenoides	
	----- µg cm ⁻² -----					
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	0,66	0,65	0,34	0,42	0,88	0,81
AHc	0,69	0,64	0,33	0,41	0,91	0,80
DMS	0,03	0,05	0,03	0,03	0,04	0,04
F fonte	3,70 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,47 ^{ns}	0,42 ^{ns}	6,22 ^{ns}	0,07 ^{ns}
F dose	0,95 ^{ns}	1,06 ^{ns}	0,53 ^{ns}	1,71 ^{ns}	2,08 ^{ns}	1,67 ^{ns}
F (Dose x fonte)	2,37 ^{ns}	4,30 ^{**}	0,59 ^{ns}	5,64 ^{**}	4,54 ^{ns}	12,21 ^{ns}
C.V.	8,35	13,27	15,17	11,12	6,64	7,86

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * - significativo a 5%, ** - significativo a 1% e ns - não significativo pelo teste F.

Foi possível verificar interações significativas entre as doses e a fonte de AHex para o teor de clorofila a e b no 2º ciclo, nos quais as maiores doses 4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹ mostraram resultados superiores em relação à testemunha (Figura 3).

Figura 3 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para o teor de clorofila a e b de plantas de alface (Botucatu-SP, 2020). (AH_{EX}: ácido húmico extraído. B: 2º ciclo)



Esse acréscimo do teor de clorofila *a* e *b* proporciona à planta um aumento da capacidade de absorção luminosa, e estimula o processo fotossintético, como a rubisco, o que confere maior assimilação de carbono. A assimilação é fundamental para o crescimento vegetal e quanto maior for o ganho de carbono pelas plantas mais estas conseguem abastecer-se com carboidratos, que atuam como esqueletos de carbono para a síntese de outros compostos e para a geração de energia de suas ligações (CARON et al., 2015). Além disso, plantas que apresentam um maior teor de clorofila podem ter taxas fotossintéticas mais elevadas (CASTRO et al., 2014).

O aumento do teor de clorofila *a* e *b* observado no presente trabalho pode ser resultado de alterações provocadas pelos AH no desenvolvimento das plantas (ZANDONADI et al., 2007; TAHIR et al., 2011; BALDOTTO; BALDOTTO, 2014), podendo influenciar no transporte de íons, na atividade respiratória, na quantidade de clorofila e na atividade de enzimas e ácidos nucleicos (NANNIPIERI et al., 1983), e no solo, podem ocasionar aumento da capacidade de troca catiônica, favorecendo a disponibilidade de nutrientes para a planta (ROCHA; ROSA, 2003).

No trabalho realizado por Fan et al. (2014), ao investigar os mecanismos fisiológicos foliar no crescimento e desenvolvimento do crisântemo utilizando AH, observou-se que o conteúdo de clorofila aumentou com o tempo de tratamento, aos 30 e 60 dias. Também foi possível observar maior acúmulo de clorofila no trabalho desenvolvido por Karakurt et al. (2009), com uso de AH no solo e via foliar, em concentrações de 0 a 40 ml L⁻¹ com aplicações após 3 semanas do plantio, e 3 vezes a cada 15 dias no cultivo de pimentas.

Para a massa fresca da parte aérea, número de folhas, comprimento do caule, diâmetro do caule e altura de plantas foi possível observar diferença significativa entre as fontes de AH avaliadas apenas para a variável massa fresca da parte aérea (Tabela 5).

Tabela 5 - Massa fresca da parte aérea, número de folhas, comprimento do caule, diâmetro do caule e altura de plantas de alface em função da aplicação de fontes de ácidos húmicos (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	Massa fresca da parte aérea(g)		Número de folhas		Comprimento do caule (cm)		Diâmetro do caule (cm)		Altura de plantas (cm)	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	122,12 b	72,08 b	18	15	4,99	0,97	1,50	0,45	11,33	10,58
AHc	127,72 a	78,00 a	18	15	5,05	0,91	1,53	0,43	11,34	10,86
DMS	1,41	0,95	0,52	0,43	0,22	0,14	0,04	0,03	0,37	0,42
F fonte	65,26**	161,51**	0,23 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,37 ^{ns}	0,98 ^{ns}	2,86 ^{ns}	2,93 ^{ns}	0,01 ^{ns}	1,81 ^{ns}
F dose	6,34 ^{ns}	32,80**	0,46 ^{ns}	2,39 ^{ns}	0,42 ^{ns}	0,98 ^{ns}	2,37 ^{ns}	9,42 ^{ns}	0,89 ^{ns}	0,61 ^{ns}
F (Dose x fonte)	4,69 ^{ns}	31,05**	1,57 ^{ns}	3,64 ^{ns}	0,33 ^{ns}	3,32 ^{ns}	0,58 ^{ns}	23,88 ^{ns}	0,32 ^{ns}	2,01 ^{ns}
C.V.	1,92	2,15	4,87	4,65	7,55	25,24	4,80	11,95	5,64	6,75

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

Para a variável massa fresca da parte aérea, foi possível observar diferença significativa entre as fontes em ambos os ciclos, com o AHc significativamente superior ao AHex. Uma possível hipótese para a diferença significativa observada entre as fontes de AH testadas é a origem dos materiais e suas composições, pois o AHex é obtido a partir de lodo de esgoto sanitário e não foi complementado com nenhuma outra fonte mineral ou orgânica. Em contrapartida, o AHc trata-se de um bioestimulante comercial (K-Humate®), fonte concentrada de AHs, derivados de Leonardita Australiana e consta em sua composição de 3% de ácidos fúlvicos e 4,8% de K₂O (informações do fabricante).

Apesar da resposta positiva do AHc ser vista em ambos os ciclos, foi possível visualizar também valores inferiores para essa variável no 2º ciclo em relação ao 1º, o que pode estar relacionado com fatores climáticos dos períodos de cultivo de cada ciclo. Observando os dados climáticos de cada ciclo, o 1º ciclo foi realizado no período de Julho a Agosto (inverno), com temperatura média entre 20 e 25° C e a umidade relativa entre 55 e 95% dentro da estufa (Figura 1), situação essa mais favorável ao bom desenvolvimento das plantas de alface, já que a temperatura ideal relatada na literatura para o cultivo é entre 15 e 25°C (EMBRAPA, 2019). No 2º ciclo, o período de cultivo foi de outubro a novembro (primavera), com temperatura média entre 25 e 35° C e umidade relativa entre 45 e 90%, no interior da estufa (Figura 2), essas circunstâncias podem ter ocasionado estresse e afetado o desenvolvimento das plantas, acarretando o florescimento precoce, a redução do tamanho e massa da cabeça e deficiência de cálcio.

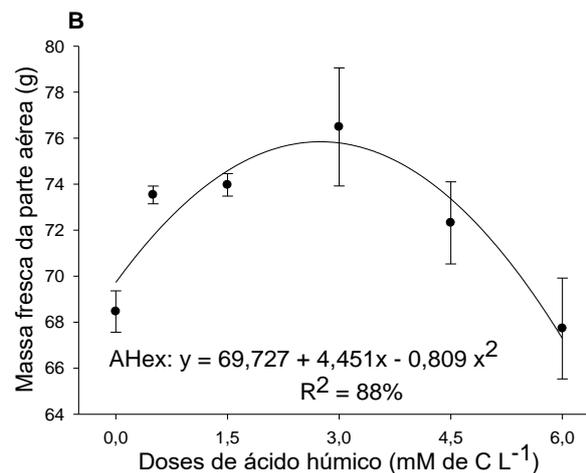
Ao analisar as informações supracitadas, é possível levantar a hipótese de que no 2º ciclo o desenvolvimento das plantas foi menor, devido a temperaturas mais elevadas dentro da estufa, o que justifica os valores inferiores de massa fresca da parte aérea. Mesmo com valores inferiores no 2º ciclo para ambos os AH, é possível verificar que a resposta das plantas ao AHc foi melhor em relação ao AHex em uma situação de estresse, quando apresentou 8% a mais de massa fresca em relação ao extraído, tendo apresentado apenas 4% a mais no 1º ciclo quando não houve estresse climático.

Resultados superiores observados para o AHc podem estar relacionados ao efeito que essas substâncias têm em mitigar o estresse biótico e abiótico (DU JARDIM, 2015), por meio da capacidade de modificar o metabolismo primário e secundário das plantas, elevando a concentração de metabólitos envolvidos diretamente na

atenuação ao estresse, como a prolina, compostos fenólicos e açúcares (GARCÍA et al., 2012, 2014, 2016; BERBARA; GARCÍA, 2014; AGUIAR et al., 2016, 2018).

Ao verificar as possíveis interações entre as fontes e as doses não foi observada diferença significativa para as variáveis de número de folhas, comprimento do caule, diâmetro do caule e altura de plantas. Entretanto, observou-se interação significativa entre a fonte de AHex e as doses no 2º ciclo para massa fresca da parte aérea das plantas (Figura 4).

Figura 4 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para massa fresca da parte aérea de plantas de alface (Botucatu-SP, 2020) (AHex: ácido húmico extraído. B: 2º ciclo)



Observando a regressão quadrática é possível visualizar um incremento na massa fresca da parte aérea até a dose de 3,0 mM de C L⁻¹. Esse resultado positivo encontrado no presente trabalho para as concentrações mais baixas de AH corrobora com o relatado por Baldotto et al. (2009), que em concentrações relativamente pequenas, os AH têm efeito de bioestimulante, e está relacionado com a atividade promovida por hormônios vegetais, como as auxinas, favorecendo assim o crescimento vegetal. Outra ação do AH em baixas concentrações é a regulação das bombas do vacúolo celular, indicando a existência de um mecanismo complexo de regulação do metabolismo energético, análogo ao conhecido para auxinas (ZANDONADI et al., 2007).

Uma hipótese para o decréscimo observado nas doses mais elevadas (4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹), é que as altas concentrações possam gerar toxidez nas plantas.

Esse mesmo comportamento das plantas em função do aumento na concentração de AH foi observado no estudo realizado por Pinheiro et al. (2010), os quais verificaram diminuição também na matéria fresca total de clones de eucalipto, e atribuíram essa queda ao excesso desse elemento, o qual causou uma possível toxidez nas plantas. Os autores Ayuso et al. (1996) e Atiyeh et al. (2002) já evidenciavam que as respostas das plantas ao uso de SH apresentam uma homogeneidade típica de maior crescimento vegetal em função do aumento gradual das concentrações, entretanto ocorre uma redução do crescimento quando estas são mais elevadas.

No trabalho realizado por Nomura et al. (2012), usando o biofertilizante Humitec® (AH e AF) em mudas de bananeira, verificaram que a produção de biomassa seca apresentou maior acúmulo até a dose 4,0 mL planta⁻¹, e com doses superiores foi observada uma redução do acúmulo. Respostas não benéficas também foram observadas nos trabalhos realizados por Bettoni et al. (2016) e Sajid et al. (2012), na produção de bulbos em plantas de cebola em função de maiores doses de SH.

Para a variável diâmetro da planta foi observada diferença significativa entre as fontes de AH avaliadas, com o AHc apresentando resultados superiores ao AHex em ambos os ciclos. Analisando os resultados da variável volume radicular é possível verificar que houve respostas diferentes para cada ciclo, com o AHc superior ao AHex no 1º ciclo e resposta inversa no 2º ciclo. Pelo fato da fonte de AHex ter sido superior ao AHc no 2º ciclo de cultivo, mesmo onde as plantas desenvolviam em ambiente cujas temperaturas estavam mais elevadas, pode levantar a ideia de que o AHex foi mais eficiente na atenuação do efeito de estresse nas plantas, como já discutido para a variável massa fresca da parte aérea (Tabela 6).

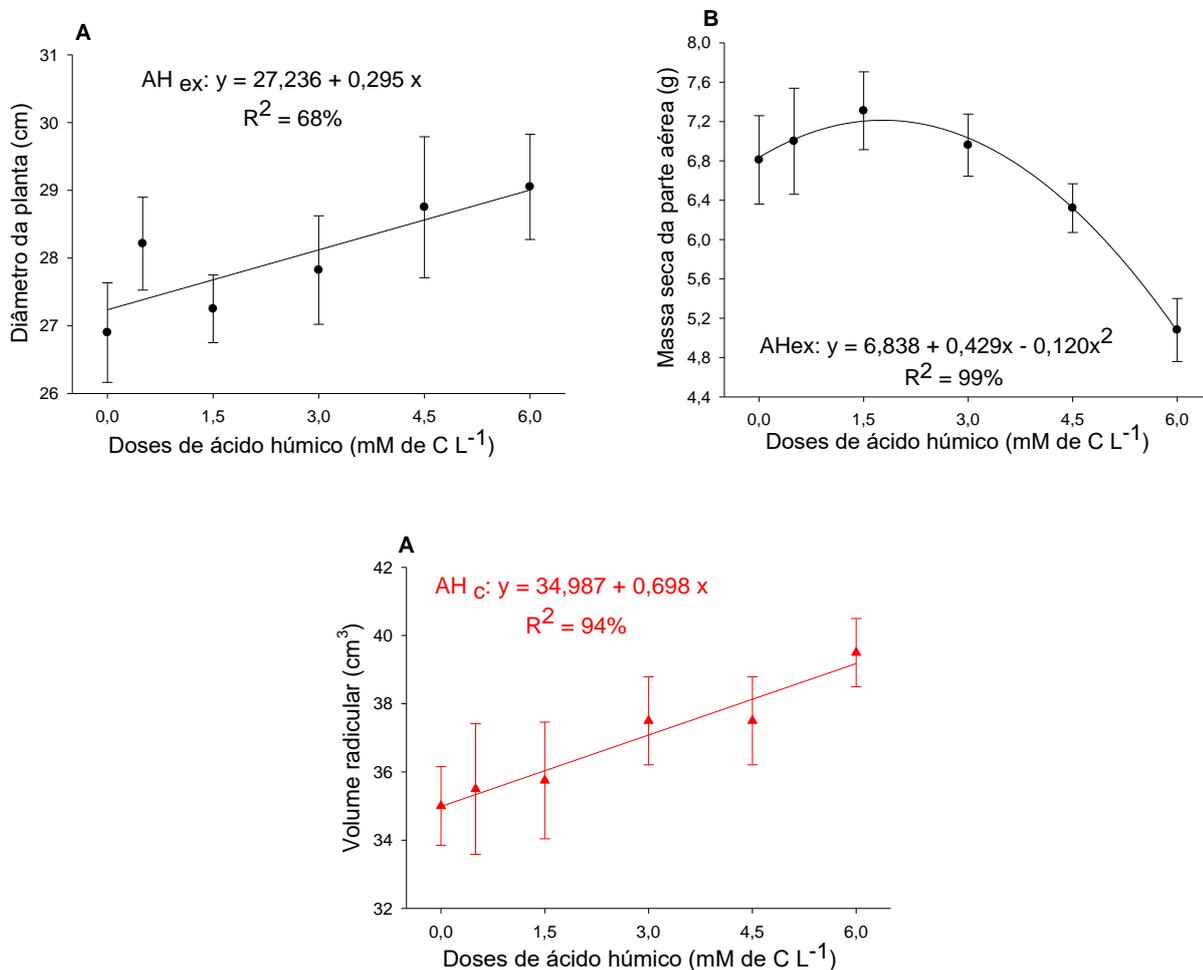
Tabela 6 - Diâmetro da planta, massa seca da parte aérea, volume radicular e índice indireto de clorofila (SPAD) de plantas de alface em função da aplicação de fontes de ácidos húmicos (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	Diâmetro da planta (cm)		Massa seca da parte aérea (g)		Volume radicular (cm ³)		Índice SPAD	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	27,99 b	25,43 b	10,70	6,58	34,29 b	19,66 a	19,94	17,03
AHc	28,61 a	26,42 a	10,82	6,72	36,79 a	18,25 b	19,55	17,25
DMS	0,46	0,50	0,19	0,23	0,79	0,78	0,81	0,73
F fonte	7,21*	16,18**	1,63 ^{ns}	1,40 ^{ns}	41,19**	13,64**	0,97 ^{ns}	0,38 ^{ns}
F dose	5,73**	3,99 ^{ns}	11,53 ^{ns}	10,44**	5,21**	1,63 ^{ns}	6,24 ^{ns}	6,25 ^{ns}
F (Dose x fonte)	3,58*	1,15 ^{ns}	2,30 ^{ns}	11,72**	6,70**	1,63 ^{ns}	0,89 ^{ns}	5,15 ^{ns}
C.V.	2,81	3,29	3,13	5,95	3,79	7,00	7,01	7,26

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

Pode-se verificar interações significativas entre as fontes e doses para as variáveis de diâmetro da planta no 1º ciclo, massa seca da parte aérea no 2º ciclo e volume radicular no 1º ciclo (Figura 5).

Figura 5 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para o diâmetro da planta, massa seca da parte aérea e volume radicular de plantas de alface (Botucatu-SP, 2020) (AH_{EX}: ácido húmico extraído. AH_C: ácido húmico comercial. y: doses. A: 1º ciclo. B: 2º ciclo)



O AH_{EX} teve influência positiva no diâmetro da planta no 1º ciclo, apresentando uma regressão linear em função das doses crescentes. Para a massa seca da parte aérea foi observado um decréscimo a partir da dose de 1,5 mM de C L⁻¹ utilizando o AH_{EX}, esse comportamento foi semelhante ao decréscimo verificado para massa fresca da parte aérea empregando a mesma fonte de AH, porém o decréscimo ocorrido para essa variável foi visto na dose 3,0 mM de C L⁻¹, podendo significar uma

alteração no conteúdo de água na planta em função das doses, pois se a massa de água na planta fosse igual, também para a massa seca a dose de maior massa seca seria de 3 mM de C L⁻¹.

O volume radicular da alface aumentou em função das doses de AHc no 1º ciclo, respondendo de forma linear e crescente às doses. Para o 2º ciclo, o volume radicular não foi afetado pelas doses de nenhum dos AHs utilizados (Figura 5). É sabido que os AHs podem favorecer o desenvolvimento das raízes (RODDA et al., 2006; ROSA et al., 2009), por meio de alterações nos níveis ou na atividade hormonal das plantas, sendo essas semelhantes à atividade exercida pelo ácido indolacético (AIA) (TREVISAN et al., 2011; CANELLAS et al., 2011).

Para os teores de macronutrientes nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre, apenas o K apresentou diferença significativa entre as fontes de AH avaliadas (Tabela 7). Essa significância visualizada do AHc em relação ao AHex para o teor de K pode ser justificada pela presença de 4,8% de K₂O na composição do produto comercial utilizado (k-humate®) como fonte de AH.

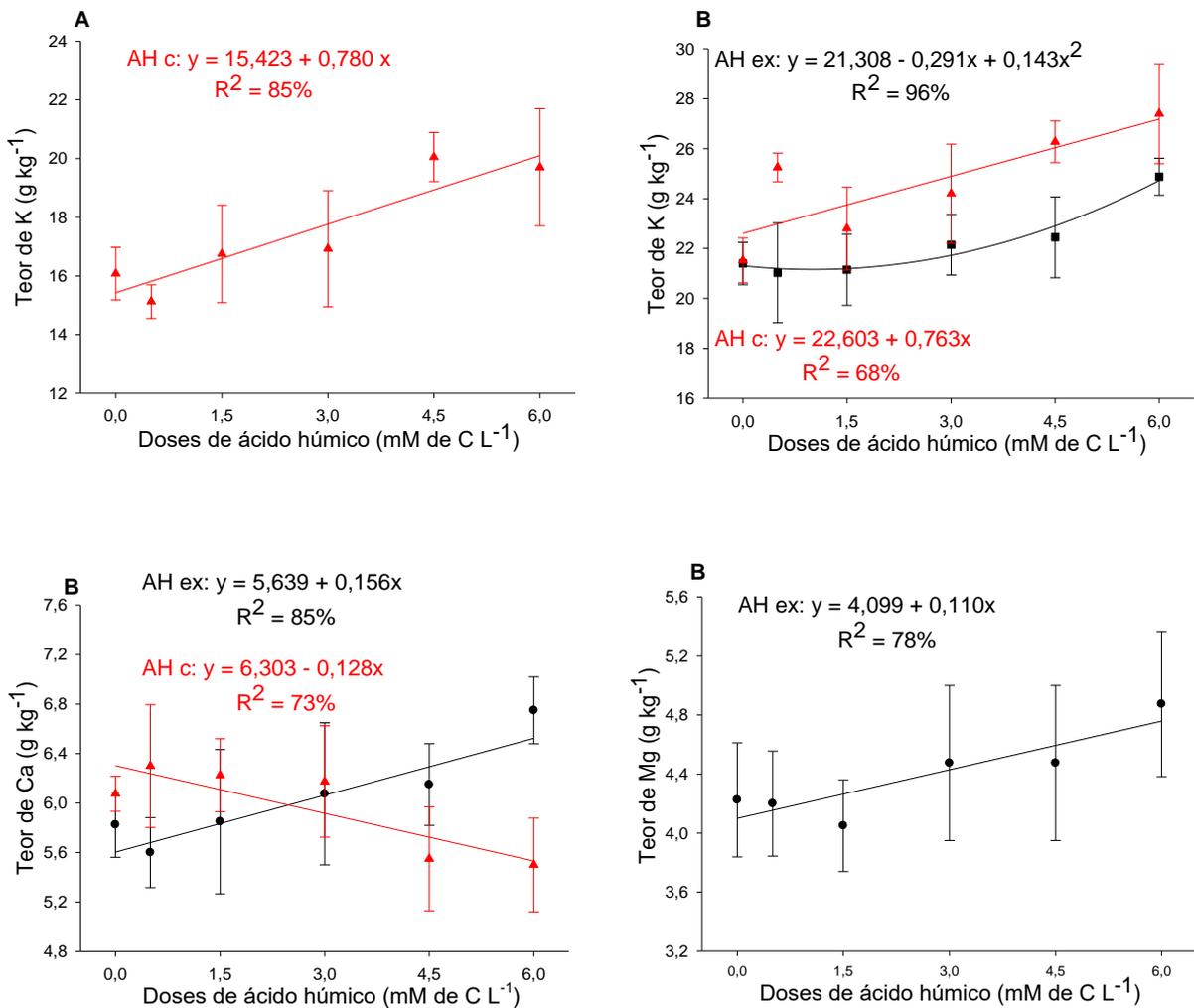
Tabela 7 - Teores de macronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	N (g kg ⁻¹)		P (g kg ⁻¹)		K (g kg ⁻¹)		Ca (g kg ⁻¹)		Mg (g kg ⁻¹)		S (g kg ⁻¹)	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	25	27	1,9	1,0	16 b	22 b	5	6	4,6	4,4	1,6	1,5
AHc	25	28	1,9	1,0	17 a	25 a	5	6	4,4	4,3	1,6	1,5
DMS	0,78	1,19	0,11	0,10	0,84	0,69	0,21	0,25	0,18	0,22	0,09	0,07
F fonte	0,12 ^{ns}	2,06 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,44 ^{ns}	15,38 ^{**}	49,99 ^{**}	0,06 ^{ns}	0,33 ^{ns}	3,66 ^{ns}	0,66 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,07 ^{ns}
F dose	2,07 ^{ns}	2,71 ^{ns}	1,17 ^{ns}	0,48 ^{ns}	4,05 ^{**}	16,57 ^{**}	0,74 ^{ns}	0,53 ^{ns}	0,77 ^{ns}	1,16 ^{ns}	2,06 ^{ns}	1,24 ^{ns}
F (Dose x fonte)	0,51 ^{ns}	2,31 ^{ns}	0,35 ^{ns}	1,37 ^{ns}	4,01 ^{**}	3,25 [*]	1,65 ^{ns}	5,76 ^{**}	0,88 ^{ns}	4,17 ^{**}	0,62 ^{ns}	0,50 ^{ns}
C.V.	5,42	7,26	10,39	18,24	8,65	5,03	7,30	7,06	6,88	8,62	9,68	8,28

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. * - significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

Analisando as interações entre as fontes e as doses para os teores de macronutrientes, foi observada diferença significativa para o teor de potássio, cálcio e magnésio (Figura 6).

Figura 6 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácidos húmicos para os teores de K, Ca e Mg de plantas de alface (Botucatu-SP, 2020) (AH_{EX}: ácido húmico extraído. AH_C: ácido húmico comercial. y: doses. A: 1º ciclo. B: 2º ciclo)



Analisando as interações entre fonte de AH_C e doses para a variável K no presente estudo (Figura 6), é possível verificar o comportamento linear das doses para ambos os ciclos, causa esta, justificada pela presença de K no produto. No trabalho de revisão realizado por Rose et al. (2014) os autores relatam que os produtos comerciais na maioria das vezes contêm misturas de SH e nutrientes de plantas

adicionados, logo, a resposta de qualquer efeito benéfico notado não pode ser facilmente atribuída a SH.

Em contrapartida, apenas no 2º ciclo foi registrada interação entre a fonte de AHex e as doses, um motivo plausível para o teor de K nas plantas não ter aumentado como ocorreu na fonte comercial, e é devido principalmente à origem do material utilizado como matéria-prima. Pois, já é sabido que o lodo de esgoto possui baixo teor de K em sua composição, fato que justifica a pouca presença desse elemento no AHex.

Para o teor de Ca (Figura 6), houve interação significativa entre as fontes de AH e as doses no 2º ciclo, apresentando regressão linear para ambas. Utilizando a fonte de AHex, foi possível verificar um aumento linear em função das doses, porém no caso do AHc ocorreu ao contrário, com resposta decrescente em função do aumento das doses.

Analisando o comportamento do teor de Ca com o teor de K quando utilizada a mesma fonte de AH, é possível que tenha ocorrido uma inibição competitiva entre esses dois elementos. O efeito antagonista é observado entre os nutrientes K, Ca e Mg, devendo estar em equilíbrio no solo para garantir a plena absorção de cada um deles. Huber et al. (2012) já haviam relacionado a diminuição na concentração de Ca nas plantas com um aumento na concentração de K.

Em relação ao teor de Mg (Figura 6), houve interação entre a fonte AHex e as doses, exibindo uma regressão linear com o incremento em função do aumento nas doses, mesmo comportamento observado para o Ca. O aumento na absorção de Mg pelas plantas, pode ser devido a algumas características já conhecidas das SH, como o aumento da atividade de H⁺-ATPases da membrana plasmática e o desenvolvimento de raízes, o que proporciona máxima absorção e transporte de nutrientes (CHEN; AVIAD, 1990; NARDI et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002; PINHEIRO et al., 2010), maior crescimento das culturas (PINHEIRO et al., 2010), respostas hormonal em raízes (TREVISAN et al., 2010) e na atividade do transportador de íons na membrana plasmática da raiz (PINTON et al., 1997; MORA et al., 2010).

Para os micronutrientes houve diferença significativa entre as fontes de AH apenas para os teores de boro, ferro e manganês (Tabela 8).

Tabela 8 - Teores de micronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	B (mg kg ⁻¹)		Cu (mg kg ⁻¹)		Fe (mg kg ⁻¹)		Mn (mg kg ⁻¹)		Zn (mg kg ⁻¹)	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	23	30 b	6	6	116 a	151 b	140	70 b	39	31
AHc	22	32 a	6	6	108 b	155 a	141	85 a	38	33
DMS	0,97	0,92	0,55	0,46	0,41	1,63	1,80	0,90	1,88	1,77
F fonte	2,89 ^{ns}	36,84 ^{**}	1,47 ^{ns}	2,65 ^{ns}	1387,17 ^{**}	24,74 ^{**}	2,56 ^{ns}	1064,19 ^{**}	0,16 ^{ns}	2,33 ^{ns}
F dose	1,16 ^{ns}	5,84 ^{**}	1,81 ^{ns}	0,61 ^{ns}	775,42 ^{ns}	80,71 ^{**}	14,91 ^{**}	105,87 ^{**}	0,51 ^{ns}	1,43 ^{ns}
F (Dose x fonte)	0,67 ^{ns}	13,11 ^{**}	0,26 ^{ns}	1,24 ^{ns}	1142,54 ^{ns}	69,54 ^{**}	12,88 ^{**}	217,81 ^{**}	0,72 ^{ns}	2,58 ^{ns}
C.V	7,43	5,06	16,77	14,03	0,62	1,81	2,18	1,99	8,33	9,45

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

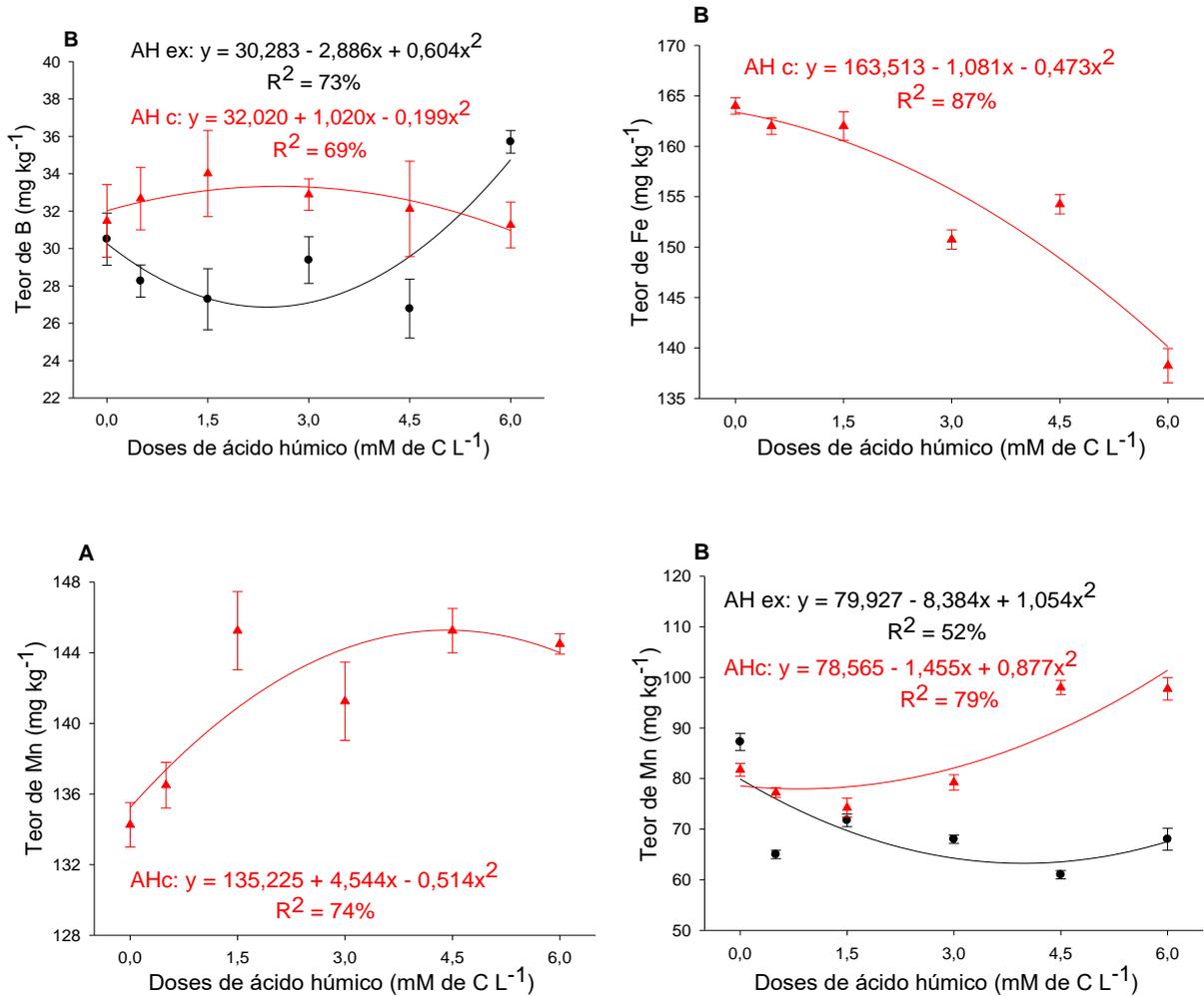
Os teores de B, Fe e Mn nas plantas de alface no 2º ciclo foram significativamente superiores quando se utilizou AHc em relação ao AHex. O contrário ocorreu para o teor de Fe, no 1º ciclo, onde o AHex aplicado, apresentou maior concentração. Essa resposta positiva para a absorção de Fe pelas plantas na presença de AH, pode ser explicada pela habilidade que essas substâncias têm em atuarem como reserva de nutrientes, através da alta capacidade de troca catiônica (CTC) e da formação de complexos solúveis em água com íons metálicos, como o ferro, favorecendo assim a absorção desses íons pelas raízes (VASCONCELOS, 2006).

Segundo Sanders et al. (1990), a utilização de AH pode favorecer o desenvolvimento das plantas, por meio do aumento na absorção de complexos de ferro pelas raízes, através da formação de quelados. E Chen et al. (2004) e Marschner (1995) relatam que a utilização de produtos à base de AH tem respostas efetivas, pelo aumento da disponibilidade de micronutrientes do solo para as plantas, sobretudo de ferro e zinco, através da complexação ou da formação de complexos destes metais com as SH.

Outros estudos relataram uma possível relação entre os efeitos das SHs na capacidade de melhorar a absorção de Fe pelas plantas, por meio do aumento da atividade de H⁺-ATPase (CHEN et al., 2004), na qual tais substâncias atuam liberando prótons pela membrana plasmática H⁺-ATPase para aumentar a solubilidade do ferro, influenciando a enzima Fe³⁺ quelato redutase ligada à membrana plasmática a reduzir Fe³⁺ a Fe²⁺ e facilitar o transporte de Fe²⁺ para células de raiz (AGUIRRE et al., 2009).

Foram obtidas respostas significativas nas interações entre as fontes e as doses de AH para os teores de B, Fe e Mn (Figura 7).

Figura 7 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácido húmico para os teores de B, Fe e Mn de plantas de alface (Botucatu-SP, 2020) (AH_{EX}: ácido húmico extraído. AH_C: ácido húmico comercial. y: doses. A: 1º ciclo. B: 2º ciclo)



Para o teor de B no 2º ciclo (Figura 7), verificou-se aumento na absorção utilizando AHc até a dose de 1,5 mM de C L⁻¹. Por outro lado, utilizando doses do AH_{EX}, o comportamento foi oposto, ocorrendo um aumento no teor a partir da dose de 3,0 mM de C L⁻¹. Analisando o desempenho das doses para cada fonte de AH na absorção de B, fica claro que as respostas das plantas estão diretamente relacionadas ao material de origem utilizado para obtenção das SH e da concentração empregada. Deve-se considerar, no entanto, que os valores observados na planta estão próximos do limite inferior de B em alface que é de 30 a 60 mg/kg, isto considerando apenas a folha diagnose. No entanto, os valores apresentados são para a parte aérea total da

planta, o que faz com que haja uma diminuição na concentração pelo efeito de diluição.

Para o teor de Fe, foi verificado resultado significativo apenas para doses utilizando o AHc no 2º ciclo (Figura 7), a qual apresentou um decréscimo na absorção desse elemento em função do aumento das concentrações. Além da curva quadrática apresentar um R^2 de 87%, as repetições apresentaram uma pequena variação, mostrando ser este um resultado consistente, e uma variação nos teores da planta de 140 a 163 mg/kg de Fe. Na dose 0 de AH, o valor observado (163 mg/kg) ultrapassa o limite de Fe adequado para alface que é de 50 a 150 mg/kg para a folha diagnose.

Segundo já relatado por Baldotto et al. (2012), a resposta das plantas à aplicação de AH de fontes distintas pode não ser semelhante, variando conforme a concentração utilizada e pelo próprio genótipo da planta. Outros autores também já evidenciaram que apesar de vários resultados mostrarem efeitos favoráveis do uso dessas substâncias nas plantas, há trabalhos que demonstram o não favorecimento ou até mesmo a diminuição da absorção de nutrientes pelas mesmas, o que pode indicar que as respostas à utilização desses produtos podem depender de outros fatores, no caso a espécie da planta e a composição das SH (CSIZINSZKY, 1990; COOPER et al., 1998; DELFINE et al., 2005). Diante o exposto, é possível que as fontes distintas e suas concentrações tenham proporcionado resultados diferentes para o teor de B e o decréscimo no teor de Fe nas plantas de alface.

Houve efeito das doses de AH no teor de Mn nas plantas de alface, porém, no 1º ciclo as maiores concentrações de Mn foram observadas nas doses mais elevadas e no 2º ciclo houve um decréscimo acentuado nos teores de Mn em função das doses. Esse efeito observado no 2º ciclo, pode ser explicado por um aumento dos teores de Fe, indicando uma possível inibição por competição na absorção do Mn provocada pela presença de Fe (MENGEL, 1994; MOREIRA, 1999; HEINRICHS, 2002).

Além da possibilidade de as condições climáticas terem reduzido a absorção de Mn no 2º ciclo. Essa redução na absorção de Mn pelas plantas de alface corrobora com os resultados apresentados por Tursun et al. (2018), os quais avaliaram o efeito da aplicação de B + AH em plantas de salsa, e constataram que a adição de AH afetou a absorção de Mn em relação ao tratamento apenas com B em 71,43%.

2.4 CONCLUSÃO

As doses de ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto proporcionou incremento na massa fresca, massa seca e diâmetro do caule das plantas de alface em resposta às menores doses de AH, havendo decréscimo dessas variáveis quando as plantas foram submetidas às maiores concentrações.

Os teores de K, Ca, Mg, B e Mn nas plantas de alface foram aumentados em função da utilização de doses de ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto, já para as doses da fonte de ácido húmico comercial foi verificado aumento nos teores de Mn e K e decréscimo para os teores de Ca, Fe e B.

REFERÊNCIAS

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

AGUIAR, N. O.; MEDICI, L. O.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; TORRES-NETTO, A.; SILVA, S. F.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P.. Metabolic profile and antioxidant responses during drought stress recovery in sugarcane treated with humic acids and endophytic diazotrophic bacteria. **Annals of Applied Biology**, 168: 203-213. 2016.

AGUIAR, N. O.; OLIVARES, F. L.; NOVOTNY, E. H.; CANELLAS, L. P.. Changes in metabolic profiling of sugarcane leaves induced by endophytic diazotrophic bacteria and humic acids. **Peer J**, 6 ed. 5445. 2018.

AGUIRRE, E.; LEMÉNAGER, D.; BACAICOA, E.; FUENTES, M.; BAIGORRI, R.; MA ZAMARREN, A.; GARCÍA-MINA, J. M.. The root application of a purified leonardite humic acid modifies the 347 transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe- 348 sufficient cucumber plants. **Plant Physiol. Biochem.** 47, 215–223. 2009.

AL-FAIYZ, Y. S. S.. CPMAS ¹³C NMR characterization of humic acids from composted agricultural Saudi waste. **Arabian J. Chem.** 10:S 839–S853, 2017.

ATIYEH, R.M.; LEE, S.; EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q. & METZGER, J.D. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bio. Technol.**, 84:7-14, 2002.

AYUSO, M.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. & PASCUAL, J.A. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. **Bio. Technol.**, 57:251-257, 1996.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R.. Desempenho do abacaxizeiro 'vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **R. Bras. Ci. Solo.** 33:979-990, 2009.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; SOARES, R. R.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A.. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. **Revista Ceres**, 59:476-483. 2012.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GONTIJO, J. B.; FERNANDA, M. O.; GONÇALVES, J.. Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. **Ciência Rural**, vol. 44, núm. 5, pp. 830-833. 2014.

BARBOSA, J. C; MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat - sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos**. Jaboticabal – SP, FCAV/UNESP. 396p, 2015.

BASSO, S. M. S. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de *Adesmia* DC. E *Lotus* L.** 1999. 268 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

BERBARA, R. L.; GARCÍA, A. C.. Humic substances and plant defense metabolism, Physiological mechanisms and adaptation strategies in plants under changing environment. In: PARVAIZ, A.; MOHD, R. W. (Eds.), **Humic Substances and Plant Defense Metabolism**. Springer, New York, pp. 297–319. 2014.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A.. **Lodo de esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Embrapa Meio Ambiente: Jaguariúna, 347p. 2006.

BETTONI, M. M.; MOGOR, A. F.; PAULETTI, V.; GOICOECHEA, N.; ARANJUELO, I.; GARMENDIA, I.. Nutritional quality and yield of onion as affected by different application methods and doses of humic substances. **Journal of Food Composition and Analysis**. 1-30. 2016.

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

CANELLAS, L. P.; DANTAS, D. J.; AGUIAR, N. O.; PERES, L. E. P.; ZSÖGÖN, A.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; FACANHA, A. R.; NEBBIOSO, A.; PICCOLO, A.. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomatoauxin mutants. *Annals of Applied Biology*, 159: 202-211. 2011.

CANELLAS, L.P.; DOBBSS, L.B.; CHAGAS, J.G.; AGUIAR, N.O.; RUMJANEKC, V.M.; NOVOTNY, E.H.; OLIVARES, F.L.; SPACCINI, R.. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **Eur. J. Soil. Sci.** 63, 315–324. 2012.

CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chem. Biol. Techn. Agri.** 1 (3), 1–11. 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. **Sci. Hort.** 196, 15–27. 2015.

CARON, V. C.; GRAÇAS, J. P.; CAMARGO e CASTRO, P.R. **Condicionadores do solo: ácidos húmicos e fúlvicos**. Piracicaba: ESALQ - Divisão de Biblioteca. 46 p. 2015.

CASTRO, F.A., CAMPOSTRINI, E., TORRES-NETO, A., GOMES, M.M.A., FERRAZ, T.M., GLENN, D.M.. Portable chlorophyll meter (PCM-502) values are related to total chlorophyll concentration and photosynthetic capacity in papaya (*Carica papaya* L.). **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, 12p. 2014.

CHAI, X.; HAO, Y.; LIU, G.; ZHAO, X.; ZHAO, Y.. Spectroscopic studies of the effect of aerobic conditions on the chemical characteristics of humic acid in landfill leachate and its implication for the environment. **Chemosphere** 91, 1058–1063. 2013.

CHEN, Y.; AVIAD, T.. Effects of humic substances on plant growth. In: MACCARTHY, P.; CLAPP, C.E.; MALCOLM, R.L.; BLOOM, P.R. (Eds.), *Humic Substances in Soil and Crop Sciences: Selected Readings*. **American Society of Agronomy**, Madison, WI. 1990.

CHEN, Y.; DE NOBILI, M.; AVIAD, T.. Stimulatory effects of humic substances on plant growth. In: Magdoff, F., Weil, R.R. (Eds.), **Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture**. CRC Press, Boca Raton, FL. 2004.

CHRISTENSEN, B.T.. Organic matter in soil: structure, function and turnover. **Tjele: DIAS**, 95 pp. 2000.

CONSELVAN, G. B.; FUENTES, D.; MERCHANT, A.; PEGGION, C.; FRANCIOSO, O., CARLETTI, P. Effects of humic substances and indole-3-acetic acid on Arabidopsis sugar and amino acid metabolic profile. **Plant Soil**. 426:17–32, 2018.

COOPER, R.J.; LIU, C.; FISCHER, D.S. Influence of humic substances on rooting and nutrient content of creeping bentgrass. **Crop Science**, Madison, v.38, p.1639-1644, 1998.

CSINZINSZKY, A. A.. Response of two bell peppers (*Capsicum annum* L.) cultivars to foliar and soil-applied biostimulants. **Soil Science Society of America Proceedings**, n. 49, p.199-203, 1990.

DAS, T.; SAIKIA, B.K.; BARUAH, B.P.; DAS, D. Characterizations of Humic Acid Isolated from Coals of Two Nagaland Coalfields of India in Relation to their Origin. **Jour. Geol. Soc.** Índia, v.86, pp.468-474, 2015.

DELFINO, S.; TOGNETTI, R.; DESIDERIO, E.; ALVINO, A. Effects of foliar application of N and humic acids on growth and yield of durum wheat. **Agronomy for Sustainable Development**, Versailles, v. 25, p. 183-191, 2005.

DU JARDIN, P.. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**. 196:3–14. 2015.

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

FAN, H.; WANG, X.; SUN, X.; LI, Y.; SUN, X.; ZHENG, C.. Effects of humic acid derived from sediments on growth, photosynthesis and chloroplast ultrastructure in chrysanthemum. **Scientia Horticulturae**. 177. 118–123. 2014.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; AMBRÓSIO DE SOUZA, L. G.; TAVARES, O. C. H.; ZONTA, E.; GOMES, E. T. M.; GARCÍA-MINA, J. M.; BERBARA, R. L. L.. Vermicompost humic acids modulate the accumulation and metabolism of ROS in rice plants. *J. Plant Physiol.* 192, 56–63. 2016.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; RUMJANEK, V. M.; CASTRO, R. N.; SANTOS, F. S.; AMBROSIO DE SOUZA, L. G.; BERBARA, R. L.. Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.). *Journal of Geochemical Exploration*, 136 pág. 48–54. 2014.

GARCÍA, A. C.; SANTOS, L. A.; IZQUIERDO, F. G.; SPERANDIO, M. V. L.; CASTRO, R. N.; BERBARA, R. L. L.. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecol. Eng.* 47, 203–208. 2012.

GUSIATIN, Z.M.; KULIKOWSKA, D.; KLIK, B. Suitability of humic substances recovered from sewage sludge to remedy soils from a former as mining area – a novel approach. *Jour Hazard Mater.*, v.338, pp.160-166, 2017.

HENRICHES, R. **Efeito do Magnésio na absorção e distribuição de manganês e zinco em Soja (*Glycine max* (L) Merrill) Cultivada em Solos de Cerrado.** 2002,105 f. Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado). CENA-USP. Piracicaba. 2002.

HUBER D, RÖMHELD V, WEINMANN M. Relationship between nutrition, plant diseases and pests. In: MARSCHNER P (Eds.). **Marschne's mineral nutrition of higher plants.** Third edition. New York: Academic Press (Elsevier), cap.10, p.283-298. 2012.

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

KARAKURT, Y.; UNLU, H.; UNLU, H.; PADEM, H.. The influence of foliar and soil fertilization of humic acid on yield and quality of pepper. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B - Soil and Plant Science.* 59, 233-237. 2009.

LIMA, A.M.; CASTRO, V. F.; ENÉAS-FILHO, J. Silicon application on plants of maize and cowpea under salt stress. *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, n. 2, p. 398-403, 2011.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações.** 2. ed. Piracicaba: POTAFOS, p. 317, 1997.

MARSCHNER, H.. **Mineral nutrition of higher plants.** London, San Diego: Academic press, 1995. 889p.

MENGEL, K. Iron availability tissues: iron chlorosis on calcareous soils. *Plant and Soil.* v.165: 275-283, 1994.

MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A.M.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCIA-MINA, J. M.. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *J. Plant Physiol.* 167, 633–642, 2010.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.

MOREIRA, A. **A Influência do Magnésio na Absoção e Transporte do Manganês e do Zinco na Soja**. 1999. 138 p. Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado). CENA-USP. Piracicaba. 1999.

MOROZESK, M.; BONOMO, M.M.; SOUZA, L.C.; ROCHA, L.D.; DUARTE, I.D.; MARTINS, I.O.; DOBSS, L.B.; CARNEIRO, M.T.W.D.; FERNANDES, M.N.; MATSUMOTO, S.T. Effects of humic acids from landfill leachate on plants: an integrated approach using chemical, biochemical and cytogenetic analysis. *Chemosphere*, v.184, pp.309-317, 2017.

NANNIPIERI, P.; MUCCINI, L.; CIARDI, C.. Microbial biomass and enzyme activities: production and persistence. *Soil Biology and Biochemistry*, 15:679-685. 1983.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 34, n. 11, p. 1527-1536, 2002.

NOMURA, E.S.; DAMATTO JUNIOR, E.R.; FUZITANI, E.J.; SAES, L.A.; JENSEN, E. Aclimatização de mudas micropropagadas de bananeira 'Grand Naine' com aplicação de biofertilizantes em duas estações do ano. *Revista Ceres*, 59: 518-529, 2012.

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. *R. Bras. Ci. Solo*. 34:1217-1229, 2010.

PINTON, R.; CESCO, S.; DE NOBILI, M.; SANTI, S.; VARANINI, Z. Water-and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. *Biology and fertility of soils*, v. 26, n. 1, p. 23-27, 1997.

RAIJ, B. V. et al. **Análises químicas para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo/FUNDAG, 2001. 285 p.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.. **Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas**. São Paulo, UNESP. 120p. 2003.

RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D.L.; SANTOS, G.A.. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto: I - efeito da concentração. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 30, n. 4, p. 649-656, 2006.

ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L. C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E. S.; DOS ANJOS LEAL, O. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 959-967, 2009.

ROSE, M. T.; PATTI, A. F.; LITTLE, K. R.; BROWN, A. L.; ROY JACKSON, W.; CAVAGNARO, T. R.. A Meta-Analysis and Review of Plant-Growth Response to Humic Substances: Practical Implications for Agriculture. **Advances in Agronomy**. V124. 2014.

SAJID, M.; RAB, A.; SHAH, S.T.; JAN, I.; HAQ, I.; HALEEMA, B.; ZAMIN, M.; ALAM, R.; ZADA, H.. Humic acids affect the bulb production of onion cultivars. **African Journal of Microbiology Research**, 6, 5769-5776. 2012.

SANDERS, D.S.; RICOTTA, J.A.; HODGES, L. Improvement of carrot stands with plant biostimulants and fluid drilling. **Hortscience**, St. Joseph, v. 25, n.2, p. 181-183, 1990.

STEVERSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2 ed New York: John Willey, 1994, 496p.

TAHIR, M. M.; KHURSHID, M. Z.; KHAN, M. K.; ABBASI, M. H. K.. Lignite-Derived Humic Acid Effect on Growth of Wheat Plants in Different Soils. **Pedosphere** 21: 124–131, 2011.

TREVISAN, S.; FRANCIOSO, O.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S.. Humic substances biological activity at the plant-soil interface. From environmental aspects to molecular factors. **Plant Signaling & Behavior**, 5:635-643. 2010.

TREVISAN, S.; PIZZEGHELLO, D.; RUPERTI, B.; FRANCIOSO, O.; SASSI, A.; PALME, K.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S.. Humic substances induce lateral root formation and expression of the early auxin-responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in Arabidopsis. **Plant Biol.** 12, 604–614. 2010.

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

TURSUN, T.; AKINCI, S.; BOZKURT, E.. Determination of the effect of humic acid on growth and development parameters of parsley (*Petroselinum sativum* Hoffm.) grown in boron soil. **Not Bot Horti Agrobo**, 47(1):183-193. 2019.

VASCONCELOS, A. C. F.. **Uso de bioestimulantes nas culturas de milho e soja**. Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura 'Luiz de Queiroz', Piracicaba, 2006.

VERLINDEN, G.; PYCKE, B.; MERTENS, J. Application of humic substances results in consistent increases in crop yield and nutrient uptake'. **Journal of Plant Nutrition**, 32:1407-1426, 2009.

WU, J.; ZHAOA, Y.; QIA, H.; ZHAO, X.; YANG, T.; DU, Y.; ZHANG, H.; WEIA, Z. Identifying the key factors that affect the formation of humic substance during different materials composting. **Bioresource Technol.** 2017.

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

ZECH, Z.; SENESI, N.; GUGGNEBERGER, G.; KAISER, K.; LEHMANN, J.; MIANO, T. M.; MILTNER, A.; SCHROTH, G.. Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79(1): 69-116. 1997.

CAPÍTULO 3

DOSES DE ÁCIDO HÚMICO EXTRAÍDAS A PARTIR DE LODO DE ESGOTO EM PLANTAS DE ALFACE CULTIVADAS EM SISTEMA HIDROPÔNICO

RESUMO

Um dos grandes desafios de vários países é no avanço de sistemas agrícolas mais sustentáveis e ecológicos, produzindo alimentos de forma mais consciente, a fim de proteger a biodiversidade, o ar, a água e o solo. Diante do exposto, fez necessário avaliar as respostas das plantas de alface a aplicação de AH proveniente de duas fontes distintas (lodo de esgoto e leonardita) e suas concentrações em sistema de cultivo hidropônico. O experimento foi realizado em ambiente protegido no inverno e primavera. O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2 x 6, sendo duas fontes (ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto “in natura” e a fonte de ácido húmico comercial k-humate®) e seis doses, com quatro repetições e três plantas por parcela. As doses utilizadas foram (0, 0,5, 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹) aplicadas a solução nutritiva proposta por Furlani, a qual foi substituída semanalmente. Após a colheita foram realizadas as seguintes avaliações: biométricas (diâmetro e comprimento do caule; diâmetro, altura e número de folhas da planta; massa fresca e seca da parte aérea); volume radicular; análise química da parte aérea; teores de pigmentos (clorofila *a*, *b* e carotenoides) e índice indireto de clorofila. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de comparação de médias (Tukey a $p \leq 0,05$) e quando significativos foram realizados estudos de regressão. A fonte de ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto quando aplicada a solução nutritiva proporcionou incremento no teor de clorofila *a* e carotenoides, número de folhas, diâmetro do caule e nos teores de N, K, B, Cu e Fe de plantas de alface, sendo a maioria das respostas positivas visualizadas nas menores concentrações. O ácido húmico comercial influenciou positivamente as seguintes variáveis: teor de clorofila *a*, massa fresca e seca da parte aérea, volume radicular e nos teores de K, Mn e Zn de plantas de alface cultivadas em solução nutritiva.

Palavras-chave: solução nutritiva; substâncias húmicas; bioestimulante; *Lactuca sativa*; hidroponia.

ABSTRACT

One of the great challenges for several countries is the advancement of more sustainable and ecological agricultural systems, producing food in a more conscious way, to protect biodiversity, air, water, and soil. In view of the above, it was necessary to evaluate the responses of lettuce plants to the application of HA from two different sources (sewage sludge and leonardite) and their concentrations in a hydroponic cultivation system. The experiment was carried out in a protected environment in winter and spring. The experimental design used was in randomized blocks, in a 2 x 6 factorial scheme, with two sources (humic acid extracted from "in natura" sewage sludge and the commercial humic acid source k-humate®) and six doses, with four replications and three plants per plot. The doses used were (0, 0.5, 1.5, 3.0, 4.5 and 6.0 mM of C L-1) applied to the nutrient solution proposed by Furlani, which was replaced weekly. After harvesting, the following evaluations were performed: biometric (diameter and length of the stem; diameter, height, and number of leaves of the plant; fresh and dry mass of the aerial part); root volume; aerial part chemical analysis; pigment contents (chlorophyll a, b and carotenoids) and indirect chlorophyll index. Data were submitted to analysis of variance by means of comparison test (Tukey at $p \leq 0.05$) and regression studies were performed when significant. The source of humic acid extracted from sewage sludge when applied to the nutrient solution provided an increase in the content of chlorophyll a and carotenoids, number of leaves, stem diameter and in the levels of N, K, B, Cu and Fe of lettuce plants, with most positive responses seen at the lowest concentrations. Commercial humic acid positively influenced the following variables: chlorophyll a content, shoot fresh and dry mass, root volume and K, Mn and Zn contents of lettuce plants grown in nutrient solution.

Keywords: nutrient solution; humic substances; biostimulant; *Lactuca sativa*; hydroponics.

3.1 INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios de vários países, na atualidade, é o avanço de sistemas agrícolas mais sustentáveis e ecológicos (POVERO et al. 2016), para produzir alimentos de forma mais consciente, protegendo, definitivamente, a biodiversidade, o ar, a água e o solo. É sabido que os fertilizantes minerais proporcionam um incremento na produtividade e na saúde das plantas (HIREL et al. 2001), entretanto o uso desses produtos deve ser realizado de forma correta e cuidadosa, procurando otimizar a aplicação e evitar a poluição.

Na busca por alternativas que possam melhorar os cultivos agrícolas de forma sustentável, várias pesquisas vêm sendo realizadas com o uso de bioestimulantes vegetais. Esses produtos são capazes de proporcionar efeitos positivos indiretos no crescimento das plantas, como crescimento e arquitetura radicular, biomassa vegetal, número de flores, resistência ao estresse abiótico/biótico (CALVO et al., 2014), aumentar a absorção e a eficiência dos nutrientes pelas plantas e a qualidade da cultura (EUROPEAN BIOSTIMULANT INDUSTRY COUNCIL, 2013).

Não existe uma definição estabelecida para bioestimulante, porém organizações internacionais e cientistas adotaram seis categorias principais: micro-organismos, hidrolisados de proteína, extratos de algas marinhas, quitosana, compostos inorgânicos e substâncias húmicas (SHs) (CALVO et al. 2014; DU JARDIN, 2015). Dentre essas categorias, as SHs são caracterizadas como compostos heterogêneos, categorizados de acordo com seus pesos moleculares e solubilidade em huminas, ácidos húmicos e ácidos fúlvicos (DU JARDIN, 2015), que proporcionam efeitos positivos na absorção de macro e micronutrientes, melhorando o metabolismo, o crescimento e a produção das plantas (BRONICK; Lal, 2005; FERRERAS et al. 2006; NARDI et al. 2009; PUGLISI et al. 2009).

Os efeitos positivos das SHs no metabolismo das plantas são atribuídos à sua atividade semelhante a alguns hormônios (auxina, giberelina ou atividade semelhante à citocina), às mudanças na arquitetura da raiz (TREVISAN et al. 2010; CANELLAS et al. 2011; MORA et al. 2012; PIZZEGHELLO et al. 2013), aumento da atividade da $H^+ -ATPase$ da membrana plasmática da raiz, elevando a absorção de nitrato e outros nutrientes pelas plantas; tudo isso contribui para o afrouxamento da parede celular, aumento da célula e crescimento de órgãos (ZANDONADI et al. 2007; JINDO et al. 2012).

As principais fontes de SHs utilizadas atualmente na agricultura são derivadas de recursos não renováveis, como turfa e carvão, havendo a necessidade de se buscar fontes sustentáveis de produtos húmicos, como por exemplo os resíduos orgânicos (CANELLAS et al., 2015). As respostas à aplicação dessas substâncias no crescimento das plantas não podem ser generalizadas, pois seus efeitos variam em função das fontes distintas, concentrações, peso molecular das frações húmicas aplicadas (NARDI et al., 2002; BALDOTTO et al., 2012) e espécies de plantas (NARDI et al. 2009; ROSE et al. 2014). Entre as possíveis fontes para extração de SHs está o lodo de esgoto, matéria-prima promissora na obtenção da fração ácido húmico (AH), que possibilita agregar valor a esse resíduo e permite ainda sua reutilização como nova fonte sustentável de produtos húmicos.

Inúmeros trabalhos relatam efeitos positivos na utilização de AH extraídos de diferentes fontes, porém a maioria deles ocorre em sistema convencional de cultivo, no caso, em solo. Os sistemas hidropônicos possuem a característica de aumentar a produção em diferentes dimensões e, minimizar o suprimento de água pela manipulação da solução nutritiva; mesmo apresentando essas vantagens ainda são poucos os trabalhos com aplicação de AH em sistemas hidropônicos (HAGHIGHI et al., 2013).

No trabalho realizado por Adani et al. (1998) os autores observaram que a aplicação de AH extraído de turfa e leonardita influenciou o crescimento e a nutrição mineral de tomateiros em cultivo hidropônico a 20 e 50 mg L⁻¹. Foi estimada também que a concentração de SHs em condições hidropônicas, mesmo as mais baixas (5 mg L⁻¹) poderiam proporcionar benefícios sobre a nutrição e o crescimento das plantas (CACCO et al., 2000; CANELLAS et al., 2002; VACCARO et al., 2015).

Diante do exposto, fez-se necessário avaliar a resposta das plantas de alface à aplicação de AH proveniente de duas fontes distintas (lodo de esgoto e leonardita) em diferentes concentrações no cultivo de alface em sistema hidropônico.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Localização e caracterização da área experimental

O experimento foi realizado em ambiente protegido no Departamento de Ciência Florestal, Solos e Ambiente da Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA/UNESP, em Botucatu-SP, no inverno e primavera. De acordo com a classificação de Koppen, o clima da região é Cfa, clima temperado quente (mesotérmico) úmido, e a temperatura

mais quente do ano superior a 22°C (CUNHA; MARTINS, 2009). A estrutura utilizada foi uma estufa protegida de vidro com temperatura controlada entre 20 e 28°C. O controle da temperatura era realizado de modo automático, através de um gerador que acionava o climatizador da estufa sempre que a temperatura interna da estufa alcançasse 28°C. Esse sistema de climatização era realizado através do reaproveitamento do ar externo e na transformação deste ar quente e seco em um ar refrigerado e úmido, em conjunto com a água que passava constantemente pelos painéis (colmeias), reduzindo assim a temperatura em relação ao ambiente externo.

3.2.2 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, em esquema fatorial 2 x 6, sendo avaliadas duas fontes de AH (ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto in natura e ácido húmico comercial) e seis doses em quatro repetições. As doses utilizadas foram baseadas nas relatadas na literatura por Canellas et al. (2010) e em função da concentração de carbono presente nos materiais (0, 0,5, 1,5, 3,0, 4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹).

Cada parcela correspondeu a três plantas que foram cultivadas em vasos com 12 cm de altura, diâmetro da boca 14,5 cm e do fundo 10,3 cm, 1,300 ml de coloração cinza marmorizado.

3.2.3 Caracterização dos tratamentos

Foram utilizados dois tipos de ácido húmico, o extraído de lodo de esgoto “in natura” (descrito no primeiro capítulo) e a fonte de ácido húmico comercial. Para caracterizar o AH extraído foi realizada uma análise através do analisador elementar automático (*Perkin Elmer*. Modelo: EA 2400 Séries II) Tabela 1.

Tabela 1 - Análise química do ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto “in natura”

pH	P(resina)	Ca	Mg	S	Na	C	H	N
		g kg ⁻¹				%		
8,6	2	11	2	4	5	24	3	2
	B	Cu	Fe	Mn	Zn	CE		
	mg kg ⁻¹					mS/cm		
	75	483	25999	229	963	1,5		

O produto comercial k-humate® foi utilizado como fonte comercial de ácido húmico, e suas principais características foram obtidas de acordo com a bula comercial: fertilizante líquido organomineral Classe A, fonte concentrada de ácidos húmicos e fúlvicos, derivados de Leonardita Australiana (mundialmente reconhecida como a fonte mais concentrada); alta capacidade de troca de cátions (CTC); 100% solúvel em água e alta estabilidade e reatividade no solo. Segundo informações da empresa fabricante, o produto favorece maior desenvolvimento radicular e melhora o aproveitamento dos fertilizantes pelas plantas, promovendo maior produtividade. Os níveis de garantia do produto foram especificados no rótulo (Tabela 2).

Tabela 2 - Níveis de garantia do produto comercial utilizado no experimento

pH	K ₂ O	COT	AH	AF	IS	CE
	----- % p/p -----					mS/cm
11	4,80	12	18	3	10	0,64

3.2.4 Elaboração e manejo da solução nutritiva

A solução nutritiva utilizada foi a proposta por Furlani et al. (1999) modificada (Tabela 3). A modificação se deu com relação aos micronutrientes que foram substituídos pelo formulado Com Micros®. Na preparação da solução nutritiva foi utilizado água potável.

Tabela 3 - Solução nutritiva utilizada nos ensaios experimentais

Solução	Fertilizante	g/100L
A	Nitrato de calcio Hydros® Especial	75,3
	Nitrato de potássio	50,0
B	Fosfato monoamônio	15,3
	Sulfato de magnésio	40,0
C	Com Micros®	2,5

Fonte: Adaptado Furlani et al. (1999).

A solução foi substituída semanalmente evitando assim o desbalanço entre o consumo e o fornecimento de sais e ácidos húmicos. O manejo da solução nutritiva foi realizado diariamente através do acompanhamento da condutividade elétrica (CE), mantida entre 1,8 e 2,0 mS cm⁻¹ e da correção do pH realizada sempre que necessário com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ e HCL 10%, mantendo-o entre 5,5 e 6,5. O ajuste da

CE foi realizado todas as vezes que esta baixasse 25% em relação à inicial, ou seja, quando diminuísse $0,25 \text{ mS cm}^{-1}$, era corrigida com a solução A e B (Tabela 4). As leituras do pH e CE da solução nutritiva foram realizadas através do Medidor portátil de pH HORIBA® modelo LAQUAtwin pH-22 e do Medidor portátil de condutividade LAQUAtwin EC-33 HORIBA®, respectivamente.

Tabela 4 - Solução nutritiva estoque utilizada nos ensaios experimentais

Solução	Fertilizante	g/1L
A	Nitrato de potássio	120,0
	Fosfato monoamônio	20,0
	Sulfato de magnésio	24,0
B	Nitrato de cálcio Hydros® Especial	60,0

Fonte: Adaptado Furlani (1999).

Para o cultivo hidropônico foi utilizado o sistema DFT (Deep Flow Technique) ou “floating”, nesse sistema a solução nutritiva forma uma lâmina profunda, na qual as raízes ficam submersas. A oxigenação da solução nutritiva foi realizada através do borbulhamento com ar comprimido individualmente para cada sistema, com duração de 15 minutos a cada 1 hora, por meio de uma bomba de ar (Figura 1).

Figura 1 - Oxigenação individual da solução nutritiva por borbulhamento com ar comprimido (Botucatu-SP, 2020)



Fonte: Marcela Caetano Lopes -2020

3.2.5 Características do material vegetal utilizado no experimento

A cultura utilizada no experimento foi a alface (*Lactuca sativa*) variedade Vera, disponibilizada pela empresa Sakata Seed. A variedade Vera tem uma alta qualidade visual em termos de tamanho, crespicidade e facilidade de comercialização, plantas de porte grande, folhas largas, com ciclo médio total de aproximadamente 60 dias e apresentam alto nível de resistência ao pendoamento precoce.

3.2.6 Avaliações

3.2.6.1 Análises biométricas

Diâmetro e comprimento do caule; diâmetro, altura e número de folhas da planta

Após a colheita, foram realizadas as medidas de diâmetro e comprimento do caule com a utilização de paquímetro. O diâmetro e altura da planta foram verificados com o auxílio de trena. Logo após, todas as folhas de cada planta foram separadas, usando um estilete e então foi realizada a contagem do número de folhas. As avaliações foram realizadas com 2 plantas de cada parcela.

Massa fresca e seca da parte aérea

Para a massa fresca da parte aérea foi separada a parte aérea da raiz e com auxílio de uma balança digital graduada em 0,001 g, foi pesado o material vegetal da parte aérea de 2 plantas de cada parcela. Após a pesagem, as amostras foram mantidas em estufa com temperatura a 65°C com circulação de ar forçada até a estabilização do peso, e, posterior a isso foi realizada a pesagem da massa seca.

3.2.6.2 Volume radicular

Para determinar o volume radicular (cm³) as raízes foram separadas da parte aérea, lavadas em água corrente até a retirada do máximo de solo e substrato possível. A determinação foi realizada por meio da medição do deslocamento da coluna de água em proveta graduada, ou seja, colocou-se as raízes em proveta contendo um volume conhecido de água (150 mL). Pela diferença, obteve-se a resposta direta do volume radicular, pela equivalência de unidades (1 mL = 1 cm³), segundo metodologia descrita por Basso (1999).

3.2.6.3 Análise química da parte aérea

No final do ciclo da cultura as plantas foram colhidas e separadas quanto à parte aérea e raiz. Em seguida os materiais foram lavados em água corrente, depois em água deionizada e, acondicionados em sacos de papel, sendo secos em estufa de circulação forçada de ar a 65 °C, até a estabilização da massa. Após secos, os materiais foram moídos em moinho do tipo Willey para a determinação dos teores de macro e micronutrientes seguindo a metodologia de Malavolta et al. (1997), no Laboratório do Departamento de Solos e Recursos Ambientais – FCA/UNESP, em Botucatu-SP.

3.2.6.4 Teores de pigmentos fotossintéticos

As extrações dos teores de pigmentos fotossintéticos foram realizadas aos 35 e 24 dias após o transplante para o 1º e 2º ciclo, respectivamente. Foram utilizados discos foliares frescos com 0,69 cm² de diâmetro. Os discos foram mantidos em tubos de ensaio contendo 1 ml de dimetilformamida (DMF) por 24 h no escuro. O extrato contendo clorofilas solubilizadas foi analisado em espectrofotômetro a $\lambda = 649$ nm (clorofila a), 665 nm (clorofila b) e 470 nm (carotenoides). A partir dos valores de absorbância, os teores de clorofilas a e b e carotenoides foram calculados a partir das equações descritas por Lee et al., (1987) e expressos em $\mu\text{g cm}^{-2}$.

$$CloA=(12\times C)-(3,11\times B)$$

Onde: CloA – Clorofila a;

C – Leitura da amostra a 663,8nm;

B - Leitura da amostra a 646,8nm;

$$CloB=(20,78\times C)-(4,88\times B)$$

Onde: CloB - Clorofila b;

C – Leitura da amostra a 663,8nm;

B - Leitura da amostra a 646,8nm.

$$CarT=((1000\times A)-(1,12\times cloA)-(34,07\times CloB)245)$$

Onde: CarT – carotenoides totais;

A - Leitura da amostra a 480nm;

CloA – Clorofila a;

CloB - Clorofila b.

3.2.6.5 Índice indireto de clorofila

Foram realizadas medições indiretas de clorofila aos 26 e 17 dias após transplante para o 1º e 2º ciclo, respectivamente. As medidas foram realizadas com o medidor eletrônico portátil de intensidade da cor verde das plantas (SPAD), modelo Digital SPAD 502 (MINOLTA). As verificações foram realizadas em 2 pontos da folha (completamente expandida), nas 3 plantas de cada parcela.

3.2.7 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste de comparação de médias (Tukey a $p \leq 0,05$) e quando significativos foram realizados estudos de regressão. As análises foram realizadas empregando-se o programa estatístico AgroEstat (BARBOSA e MALDONADO JÚNIOR, 2015) e os resultados significativos para as doses foram apresentados na forma gráfica, com o auxílio do programa SigmaPlot 12.5.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 5 estão apresentados os dados correspondentes aos teores de clorofila *a*, *b* e carotenoides de plantas de alface em resposta à aplicação de fontes e doses de AH em dois ciclos de cultivo hidropônico. É possível verificar um teor mais elevado da clorofila *a* em relação à clorofila *b*, justificada pelo fato da clorofila *a* ser o principal pigmento envolvido na fotossíntese. Para ambas as variáveis analisadas pode-se observar diferença significativa entre as fontes de AHs, com o AHc sendo superior ao AHex no 1º ciclo, no entanto para o 2º ciclo as fontes não apresentaram diferenças entre si.

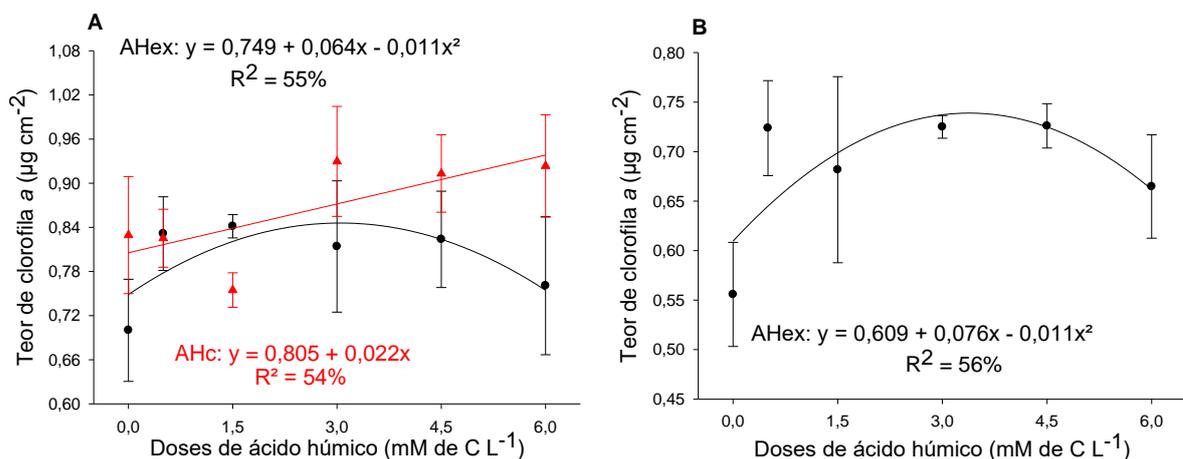
Tabela 5 – Teor de clorofila a, b e carotenoides em plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020)

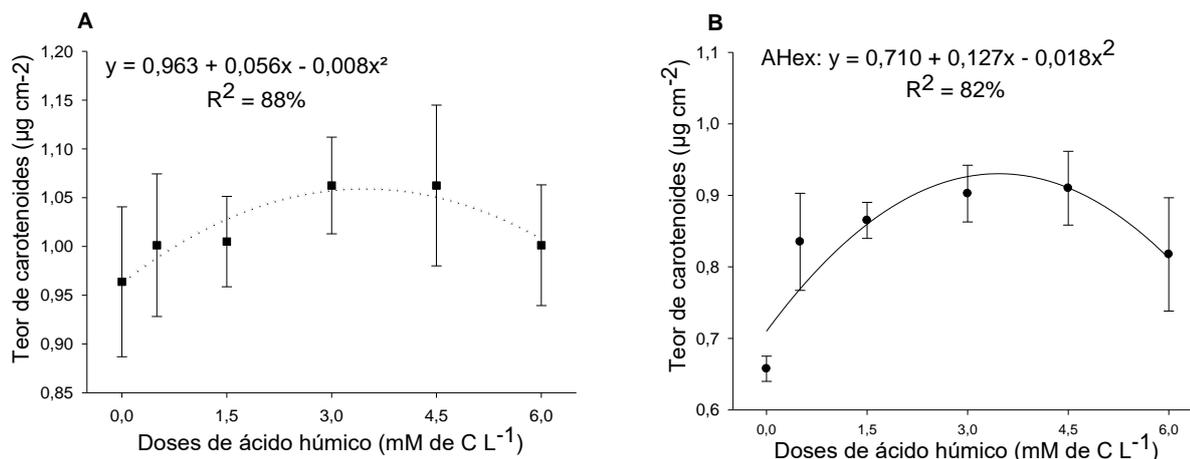
ÁCIDOS HÚMICOS	Clorofila a		Clorofila b		Carotenoides	
	----- µg cm ⁻² -----					
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	0,79 b	0,68	0,45 b	0,45	0,98 b	0,83
AHc	0,86 a	0,66	0,48 a	0,42	1,06 a	0,83
DMS	0,03	0,02	0,03	0,03	0,02	0,03
F fonte	20,53**	2,59 ^{ns}	4,66*	2,39 ^{ns}	28,45**	0,09 ^{ns}
F dose	5,21**	4,01**	0,44 ^{ns}	1,07 ^{ns}	5,31**	7,26**
F (Dose x fonte)	6,77**	14,53**	1,52 ^{ns}	5,30**	1,56 ^{ns}	12,78**
C.V.	6,22	7,12	10,87	13,61	4,71	7,51

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

Observando o efeito das doses de AHs foi possível verificar que houve significância para o teor de clorofila a e carotenoides de plantas de alface em ambos os ciclos (Figura 2).

Figura 2 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácido húmico para o teor de clorofila a e carotenoides de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020). (AHex. ácido húmico extraído. AHc. ácido húmico comercial. Y. doses. A. 1º ciclo. B. 2º ciclo)





Analisando a interação entre doses e a fonte de AHex para o teor de clorofila *a*, é possível visualizar que em ambos os ciclos houve um aumento em função das doses, porém esse aumento foi expressivo até a dose de 3 mM de C L⁻¹, sendo observada uma queda utilizando doses maiores de AHex nas plantas de alface.

O AHex proporcionou aumento no teor de clorofila *a* em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico em ambos os ciclos até a dose de 3,0 mM de C L⁻¹ (36 mg de C L⁻¹). No caso do AHc foi observado acréscimo linear do teor de clorofila *a* em função do aumento das doses nas plantas de alface apenas no 1º ciclo. Esse aumento do teor de clorofila pode estar relacionado à ação dos AHs em ativarem a enzima H⁺-ATPase da membrana plasmática, gerando uma acidificação à região rizosférica e aumentando a capacidade de captação de NH₄⁺ e NO₃⁻, promovendo assim maior síntese de moléculas de clorofila (ZANDONADI et al. 2007; CANELLAS; OLIVARES, 2014).

No trabalho realizado por Haghighi et al. (2013) utilizando doses de 25 e 50 mg L⁻¹ de AH extraído de solo de floresta humificada do Monte Jinyun, Chongqing-China na cultura do tomate em sistema hidropônico, os autores observaram aumento do conteúdo de clorofila *a*. Utilizando AH extraído de Leonardita na dose de 1 mg de C L⁻¹ em sistema hidropônico, Ertani et al. (2011) também observaram aumento do conteúdo de clorofila em plantas de milho em comparação a plantas não tratadas. Alguns autores já haviam relatado o efeito mais acentuado no conteúdo de clorofila e na estimulação das atividades enzimáticas relacionadas à via fotossintética nas plantas tratadas com SHs (PASSERA et al., 1991; NARDI et al., 2002; KARAKURT et al., 2009; ERTANI et al., 2013; ROCHA, 2014).

Ao analisar a resposta das plantas acerca da utilização de diferentes fontes e doses de AH para o teor de clorofila, foi possível observar que ambas as fontes proporcionaram respostas positivas, mesmo utilizando doses tão distintas. Esse comportamento pode ser explicado pela diferença nas fontes de AHs utilizadas em cada trabalho supracitado, como já relatado por Nardi et al. (2002) e Baldotto et al. (2012), as respostas e efeitos fisiológicos específicos das plantas e as substâncias húmicas (SHs) não são análogas, variando conforme a matéria-prima das quais esses compostos são extraídos, a sua concentração, o peso molecular e o genótipo da planta.

Para o teor de carotenoides, no 1º ciclo de cultivo, não houve interação significativa evidenciada entre as fontes e as doses, podendo observar um comportamento independente entre os fatores. Entretanto, foi possível verificar diferença significativa entre as doses empregadas, o que levanta a hipótese de que as concentrações utilizadas no presente trabalho tenham influenciado no aumento do teor de carotenoides. Para o 2º ciclo, foi observada interação entre o AHex e as doses utilizadas, com um aumento crescente até a dose de 4,5 mM de C L⁻¹ (Figura 2).

Os carotenoides são chamados de pigmentos acessórios, assim como a clorofila *b*, e auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação (TAIZ; ZIEGER, 2004; STREIT et al., 2005). Segundo Tawata (2010) e Viacava et al. (2014) a alface apresenta teores apreciáveis de carotenoides, o que pode ser confirmado no trabalho realizado por Dias et al. (2020) avaliando a concentração de carotenoides em hortaliças folhosas (alface, rúcula e cebolinha), constatou maior teor nas plantas de alface.

No trabalho realizado por Barcelos (2015), avaliando os efeitos de AHs extraídos de lodo de esgoto sanitário, manguezal e vermicomposto em plântulas de milho, também se observou aumento no teor de carotenoides para o tratamento com AH extraído de lodo de esgoto sanitário na concentração 1,0 mM C L⁻¹, quando comparado ao controle e à maior concentração de AH extraído de manguezal (6,76 mM C L⁻¹).

Para a massa fresca da parte aérea de plantas de alface foi observada diferença significativa entre as fontes de AHs avaliadas para ambos os ciclos, sendo que no 1º ciclo o AHc foi superior estatisticamente ao AHex, resultado esse que não se repetiu para o 2º ciclo. Para as demais variáveis analisadas: número de folhas, comprimento do caule, diâmetro do caule e altura de plantas, foram observadas

diferenças significativas apenas no 1º ciclo de cultivo, todas apresentando superioridade do AHc em relação ao AHex (Tabela 6).

Uma possível hipótese para a diferença significativa observada entre as fontes de AH testadas é a origem dos materiais e suas composições, pois o AHex é obtido a partir de lodo de esgoto sanitário e não foi complementado com nenhuma outra fonte mineral ou orgânica. Em contrapartida, o AHc trata-se de um bioestimulante comercial (K-Humate®), fonte concentrada de AHs, derivados de Leonardita Australiana e consta em sua composição de 3% de ácidos fúlvicos e 4,8% de K₂O (informações do fabricante).

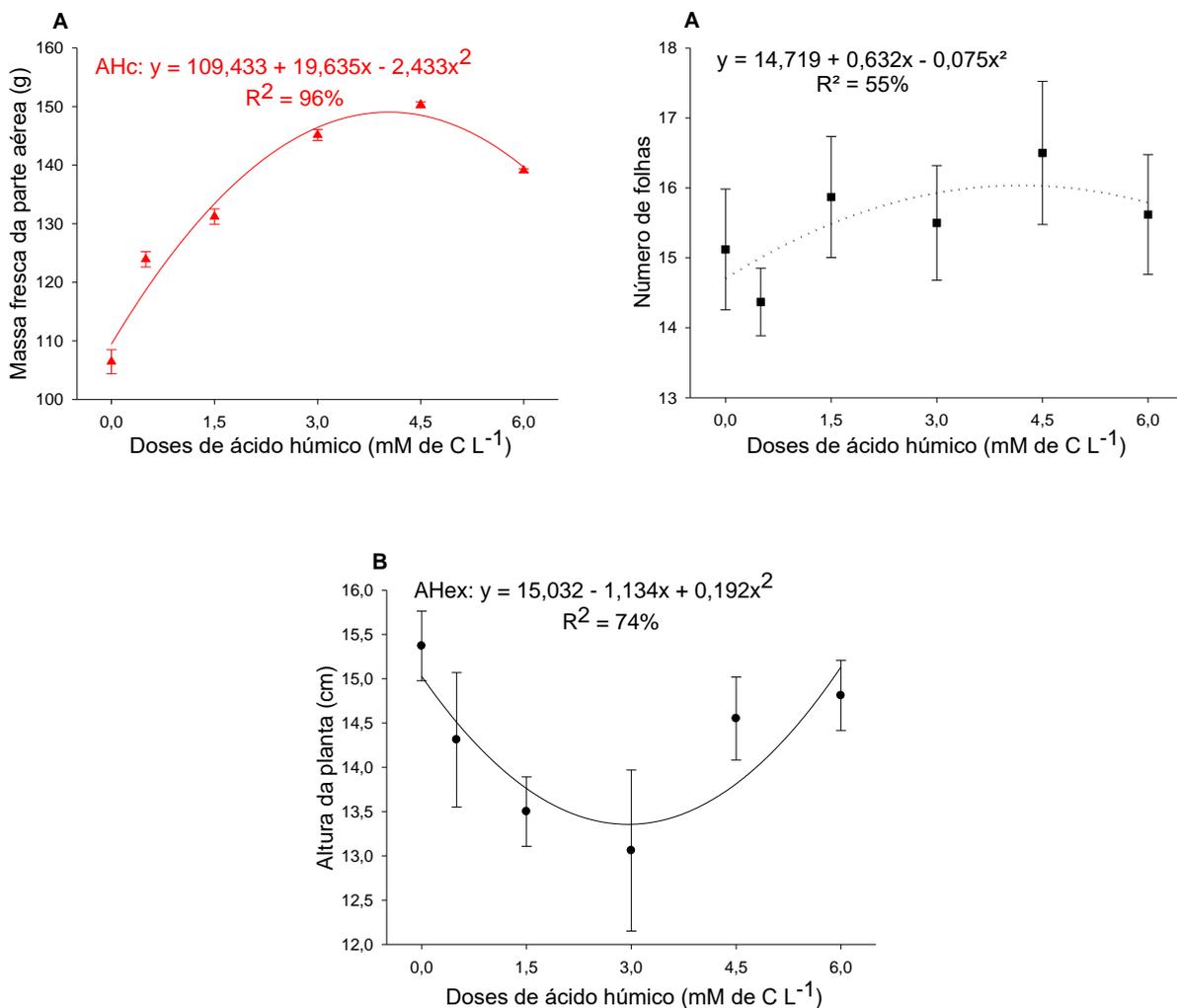
Tabela 6 - Massa fresca da parte aérea, número de folhas, comprimento do caule, diâmetro do caule e altura de plantas de alface em função da aplicação de fontes de ácidos húmicos em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	Massa fresca da parte aérea (g)		Número de folhas		Comprimento do caule (cm)		Diâmetro do caule (cm)		Altura de planta (cm)	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	114,40 b	160,24 a	15 b	15	3,14 b	3,12	1,36 b	2,02	16,19 b	14,26
AHc	132,68 a	157,87 b	16 a	15	3,35 a	3,21	1,46 a	2,01	16,59 a	14,39
DMS	2,42	1,43	0,44	0,42	0,21	0,19	0,09	0,08	0,33	0,39
F fonte	234,92**	11,35**	9,51**	0,17 ^{ns}	4,26*	0,79 ^{ns}	4,60*	0,05 ^{ns}	5,85*	0,43 ^{ns}
F dose	55,45**	87,37 ^{ns}	7,31**	0,67 ^{ns}	0,86 ^{ns}	1,72 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,54 ^{ns}	1,09 ^{ns}	2,26 ^{ns}
F (Dose x fonte)	15,27**	38,27 ^{ns}	1,49 ^{ns}	1,17 ^{ns}	0,39 ^{ns}	1,31 ^{ns}	0,41 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,62 ^{ns}	8,26**
C.V.	3,34	1,53	4,83	4,82	11,10	10,54	10,84	6,72	3,44	4,66

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

O resultado para massa fresca da parte aérea foi significativo apenas para interação das doses com a fonte de AHc, a qual apresentou aumento até a dose de 4,5 mM de C L⁻¹ (Figura 3).

Figura 3 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácido húmico para massa fresca da parte aérea, número de folhas e altura de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020) (AH_{EX}. ácido húmico extraído. AH_C. ácido húmico comercial. Y. doses. A. 1º ciclo. B. 2º ciclo)



O aumento para essa variável pode ser justificado devido às propriedades benéficas das SHs, as quais são capazes de proporcionar melhor qualidade e produtividade às culturas, entretanto como verificado no presente trabalho e relatado por Rauthan e Schnitzer (1981), as plantas respondem às SHs até uma dose específica, podendo após isso apresentar efeitos deletérios. As respostas mais eficientes das SHs são quando utilizadas em pequenas concentrações, pois favorece

o bom desempenho dos processos vitais das plantas e permite a obtenção de maiores colheitas e melhor qualidade dos produtos (CASILLAS et al., 1986; ZHANG; SCHMIDT, 2000).

No cultivo hidropônico, os efeitos das SHs à absorção dos nutrientes dependem da origem dessa substância, do tipo e concentração da solução nutritiva, da espécie e variedade de planta avaliada (AYUSO et al., 1996), e pelos fatores ambientais, tais como salinidade, oxigenação, temperatura, pH da solução nutritiva, intensidade de luz, fotoperíodo, temperatura e umidade do ar (ADAMS, 1994).

Resultados favoráveis à utilização de SHs no cultivo hidropônico foram verificados por Azan e Malik (1982), que verificaram maior crescimento das raízes do trigo estimulado pela adição de SHs adicionadas a uma solução nutritiva. Recentemente, Velasco et al. (2016) utilizando AHs na produção de alface hidropônica, observaram maior massa fresca da planta em relação à testemunha.

Para a variável número de folhas no 1º ciclo de cultivo houve diferença significativa entre as doses utilizadas (Figura 3), apresentando uma regressão quadrática crescente até a dose de 4,5 mM de C L⁻¹. O resultado obtido mostra que independente da fonte de AH testado, a utilização até uma determinada concentração, pode aumentar o número de folhas de plantas de alface.

Resultado semelhante foi observado por Borcioni et al. (2016), com aplicação de SHs em plantas de alface e observaram maior número de folhas até a dose de 4 ml L⁻¹, ocorrendo uma diminuição a partir dessa concentração. Rego et al. (2018) estudando o comportamento de soluções contendo AH (0, 25, 50, 75 e 100%), observaram um aumento gradativo para o número de folhas de mudas de alface, onde na ausência de AHs (0%) obteve média de 4,8 folhas por planta, com o aumento da diluição em torno de 65%, a média foi de 5,2 folhas por planta. A partir desta concentração, o número de folhas reduziu drasticamente, sobretudo após a diluição de 75% de AH, onde o número de folhas observado foi em média de 4,6 folhas por planta. Essa característica é relevante para a cultura da alface, visto que o número de folhas por planta é um atributo importante, uma vez que a aquisição da hortaliça pelo consumidor é feita por unidade, e não por peso (MOTA et al., 2001).

Para a altura da planta de alface houve interação significativa entre as doses e a fonte de AHex, apresentando resultados positivos apenas para as maiores doses (4,5 e 6,0 mM de C L⁻¹) (Figura 3). A resposta para essa variável às doses mostra-se contrária a todas as outras variáveis acima observadas, as quais apresentaram

resultados positivos utilizando as menores concentrações de AH. Por tratar-se de uma característica não determinante para a comercialização da alface, como é o número de folhas, por exemplo, é recomendável a utilização de concentrações mais baixas dessas substâncias, as quais podem favorecer variáveis mais importantes na hora da comercialização, como a massa fresca e número de folhas das plantas. Silva et al. (2000b) avaliaram a produção de forragem e o desenvolvimento das raízes da aveia-preta (*Avena strigosa*) colhida em estágio de grão pastoso cultivada com solução nutritiva e três níveis de SHs (10, 20 e 30 mg L⁻¹), e observaram aumento de 41,66% na altura das plantas de aveia quando utilizada a 30 mg L⁻¹ em relação ao controle.

As variáveis diâmetro da planta e massa seca da parte aérea apresentaram resultados significativos entre as fontes de AHs para o 1º ciclo de cultivo, com resposta superior para o AHc, no entanto para o 2º ciclo as fontes não diferiram entre si (Tabela 7). Para o volume radicular houve resposta significativa entre as fontes avaliadas apenas no 2º ciclo, sendo o AHex superior ao AHc. E para a variável índice indireto de clorofila (SPAD) ambos os ciclos apresentaram significância entre as fontes testadas, com resultados superiores para o AHc (Tabela 7).

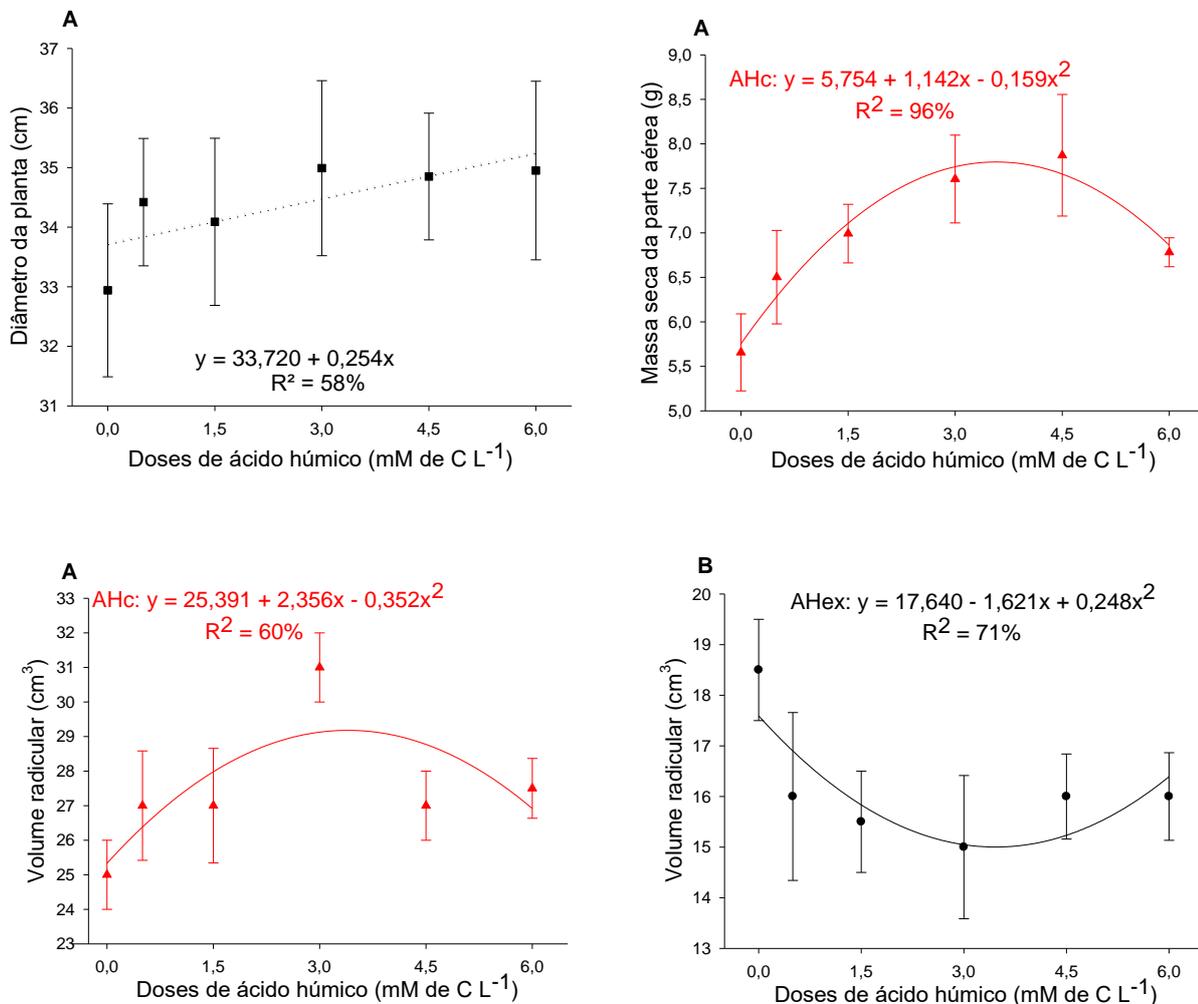
Tabela 7 - Diâmetro da planta, massa seca da parte aérea, volume radicular e índice indireto de clorofila (SPAD) de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	Diâmetro da planta (cm)		Massa seca da parte aérea (g)		Volume radicular (cm ³)		Índice SPAD	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	33,60 b	32,31	6,11 b	8,21	27,33	16,25 a	18,87 b	16,70 b
AHc	35,15 a	32,39	6,91 a	8,30	27,50	14,93 b	20,00 a	17,83 a
DMS	0,74	0,67	0,37	0,27	0,75	0,66	0,83	0,73
F fonte	18,28**	0,06 ^{ns}	18,63**	0,47 ^{ns}	0,20 ^{ns}	16,11**	7,55**	9,64**
F dose	3,12*	3,77 ^{ns}	2,97*	8,17 ^{ns}	23,13**	2,64*	0,56 ^{ns}	0,55 ^{ns}
F (Dose x fonte)	0,17 ^{ns}	3,27 ^{ns}	6,83**	5,38 ^{ns}	11,36**	4,06**	3,83 ^{ns}	2,91 ^{ns}
C.V.	3,65	3,53	9,69	5,53	4,66	7,28	7,33	7,26

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

Para o diâmetro do caule de plantas de alface não foi observada interação significativa entre as fontes e as doses no 1º ciclo de cultivo, sendo esses fatores independentes entre si (Figura 4). Apesar das fontes de AHs testadas não terem influenciado essa variável, as concentrações crescentes dessas substâncias proporcionaram aumento linear do diâmetro do caule.

Figura 4 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácido húmico para diâmetro da planta, massa seca da parte aérea e volume radicular de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020) (AH_{EX}. ácido húmico extraído. AH_C. ácido húmico comercial. Y. doses. A. 1º ciclo. B. 2º ciclo)



O resultado observado no presente trabalho para essa variável não corrobora com o verificado por Rego et al. (2018) os quais avaliaram o comportamento de soluções contendo AHs nas concentrações de 0, 25, 50, 75 e 100% em mudas de

alface, e observaram redução nas médias do diâmetro do caule com o aumento da concentração dos AHs até aproximadamente 66% e, a partir dessa, houve um aumento nas médias para essa variável. Respostas semelhantes foram observadas nos estudos com outras culturas, como no trabalho de Cavalcante et al. (2013) que observaram redução no diâmetro do caule em mudas de maracujá com aplicações de SHs. E por Nomura et al. (2012), testando dois biofertilizantes comerciais na cultura da banana no inverno, encontraram uma diminuição no diâmetro do caule.

A variável massa seca da parte aérea apresentou interação significativa para o ajuste quadrático entre as doses e a fonte de AHc para o 1º ciclo (Figura 4). Para essa variável nas condições do estudo, ocorreu um incremento da massa seca da parte aérea em resposta ao aumento da concentração do AH até a dose de 4,5 mM de C L⁻¹ e, posterior a essa diluição, houve uma redução desta variável.

Esse aumento na biomassa pode estar relacionado com a bioatividade das SHs, podendo proporcionar efeitos parecidos com os ocasionados pelas auxinas às plantas (QUAGGIOTTI et al., 2004; MUSCOLO et al., 2007; TREVISAN et al., 2010a) e com a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática (CANELLAS; SANTOS, 2005). No trabalho realizado por Rosa et al. (2009) avaliando doses crescentes de SHs (0; 2,5; 5; 10; e 20 mg L⁻¹ de C) em solução nutritiva com plantas de feijão aos 28 dias, observaram aumento na produção de massa seca da parte aérea em até 30 %, e estimou-se que o rendimento máximo para essa variável foi obtido com a dose de 11 mg L⁻¹ de C.

No caso da resposta da planta à dose de 6 mM de C L⁻¹, como já observado para massa fresca da parte aérea e número de folhas, variáveis que também demonstraram reduções quando submetidas a essas concentrações, é possível que essas respostas negativas possam estar relacionadas a uma possível toxidez causada pelo excesso dessa substância, resultados esses que já foram observados por alguns autores como Rauthan e Schnitzer (1981); Casillas et al. (1986); Ayuso et al. (1996); Zhang e Schmidt (2000); Atiyeh et al. (2002); Pinheiro et al. (2010); Nomura et al. (2012); Sajid et al. (2012) e Bettoni et al. (2016).

Para a variável volume radicular houve interação significativa entre a fonte de AHc e as doses no 1º ciclo, apresentando aumento para essa característica com a utilização de até 3,0 mM de C L⁻¹. Já para o 2º ciclo, a resposta significativa foi observada fazendo-se uso da fonte de AHex, podendo verificar um decréscimo no volume radicular em função do aumento das doses (Figura 4).

O resultado observado no 1º ciclo utilizando doses de AHc está de acordo com o relatado por alguns autores, em que geralmente concentrações mais baixas de AH apresentam atividade estimulante na fisiologia das plantas, e que concentrações elevadas resultam na diminuição do crescimento e desenvolvimento das plantas independente da fonte de matéria orgânica utilizada (BALDOTTO et al., 2009; BALDOTTO; BALDOTTO, 2013; BALDOTTO; BALDOTTO, 2014a).

O efeito positivo das SHs no aumento das raízes das plantas pode estar ligado à presença de compostos semelhantes às auxinas (CANELLAS et al., 2002; FAÇANHA et al., 2002; NARDI et al., 2002; ZANDONADI et al., 2007; TREVISAN et al., 2010a) capazes de promover a formação de raízes laterais (CANELLAS et al., 2002; TREVISAN et al., 2010b; BALDOTTO et al., 2011; JINDO et al., 2012; MORA et al., 2012), de raízes adventícias (BALDOTTO et al., 2012; BALDOTTO; BALDOTTO, 2014b), o alongamento radicular (SILVA et al., 2000) e a formação de pelos radiculares (CANELLAS et al., 2011; SILVA et al., 2011), contribuindo assim para o maior crescimento do sistema radicular das plantas e conseqüentemente para maior absorção de água e de nutrientes (EYHERAGUIBEL et al., 2008). No trabalho realizado por Canellas et al. (2008) verificaram incremento nas características de crescimento radicular em plântulas de milho cultivadas em soluções contendo AH.

Para os teores de macronutrientes foram observadas diferenças significativas entre as fontes de AHs avaliadas apenas nos teores de N, K e Mg de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico (Tabela 8). Verificou-se resposta positiva para o teor de N nas plantas de alface utilizando a fonte de AHex apenas no 1º ciclo, mostrando-se inferior ao AHc no 2º ciclo. A significância observada do AHc em relação ao AHex para o teor de K, possivelmente é devido à composição do produto comercial utilizado (k-humate®) como fonte de AH que possui 4,8% de K₂O. Também houve diferença significativa entre as fontes utilizadas para o teor de Mg, sendo o AHc superior ao AHex no 2º ciclo de cultivo.

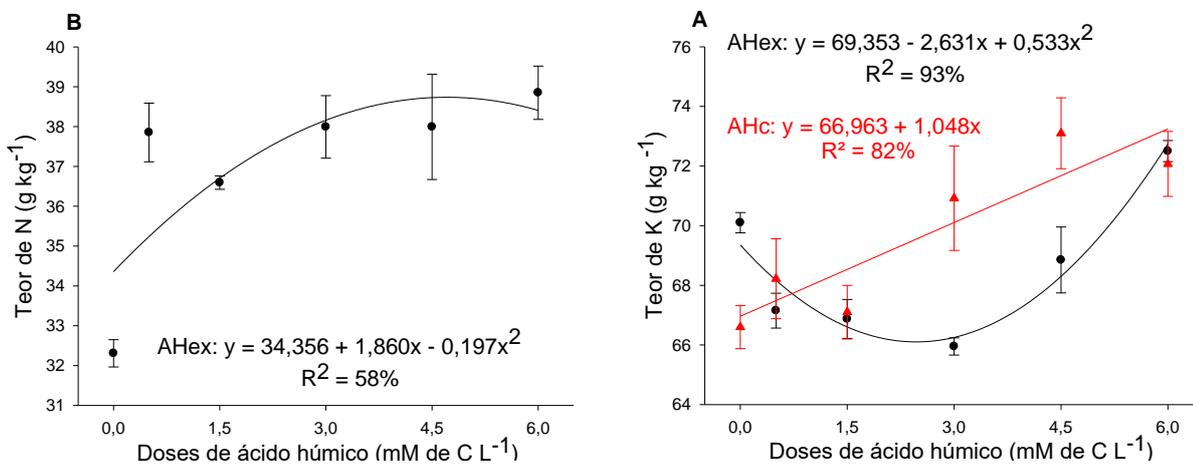
Tabela 8 - Teores de macronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	N (g kg ⁻¹)		P (g kg ⁻¹)		K (g kg ⁻¹)		Ca (g kg ⁻¹)		Mg (g kg ⁻¹)		S (g kg ⁻¹)	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	42 a	37 b	1,2	6,2	69 b	65	9	8	3,6	2,3 b	2,4	2,2
AHc	41 b	38 a	1,1	6,1	70 a	64	10	8	3,7	2,4 a	2,5	2,1
DMS	0,89	0,55	0,05	0,32	0,64	0,58	0,36	0,29	0,14	0,07	0,19	0,17
F fonte	4,24**	13,71**	2,48 ^{ns}	1,24 ^{ns}	12,10**	1,68 ^{ns}	0,43 ^{ns}	0,24 ^{ns}	2,80 ^{ns}	4,42*	0,43 ^{ns}	0,16 ^{ns}
F dose	3,92 ^{ns}	24,91**	1,59 ^{ns}	1,83 ^{ns}	28,17**	49,16 ^{ns}	2,01 ^{ns}	1,75 ^{ns}	0,43 ^{ns}	1,19 ^{ns}	0,98 ^{ns}	1,11 ^{ns}
F (Dose x fonte)	4,32 ^{ns}	17,41**	0,22 ^{ns}	2,36 ^{ns}	16,39**	80,09 ^{ns}	1,42 ^{ns}	3,98 ^{ns}	1,28 ^{ns}	4,01 ^{ns}	0,44 ^{ns}	1,27 ^{ns}
C.V.	3,66	2,50	8,01	9,08	1,58	1,54	6,43	6,48	6,84	5,63	13,58	14,04

Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

Verificou-se diferença significativa entre as doses de AHex utilizadas para o teor de N em plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico (Figura 5). Foi possível observar um aumento do teor de N nas plantas de alface em função das doses crescentes de AHex na solução nutritiva, evidenciando que o AH pode influenciar positivamente na absorção de N pelas plantas. Para o teor de K houve significância entre as doses para ambos os AHs testados no 1º ciclo. O AHc apresentou comportamento linear em função do aumento das doses, esse resultado pode ser justificado pela composição do produto comercial utilizado como fonte de AH possuir 4,8% de K₂O. Já o AHex não apresentou o mesmo desempenho, proporcionando um aumento no teor de K foliar em relação a testemunha apenas para a maior concentração (Figura 5).

Figura 5 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácido húmico para os teores de N e K de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020) (AHex: ácido húmico extraído. AHc: ácido húmico comercial. A. 1º ciclo. B. 2º ciclo)



As SHs têm a capacidade de aumentar o rendimento das plantas e estimular direta ou indiretamente a absorção radicular de nutrientes, independente da sua origem, natureza e características (AYUSO et al., 1997; NARDI et al., 2002), sendo também fonte de nutrientes como fósforo, nitrogênio e potássio (PANUCCIO et al., 2001).

Vários estudos buscam elucidar os meios celulares e moleculares da atuação dos AHs no sistema radicular, porém esse mecanismo ainda não foi totalmente

esclarecido, contudo algumas hipóteses surgiram por meio de trabalhos consolidados, tentando explicar a ação dessas substâncias na absorção de íons pelas raízes (BALDOTTO; BALDOTTO, 2014b). Uma dessas hipóteses é o aumento na solubilidade do complexo húmico-metal, o que facilita a absorção principalmente de micronutrientes (CHEN; AVIAD, 1990; PINTON et al., 1999; CHEN et al., 2004). A outra trata do aumento da permeabilidade das membranas celulares, provocada pela ação surfactante que os AHs têm, conseqüentemente, facilitando a entrada de íons e a nutrição celular (VISSER, 1985).

Outros estudos relatam também a ação dessas substâncias na estimulação da atividade e promoção da síntese das enzimas H⁺-ATPases da membrana plasmática (NARDI et al., 1991; FAÇANHA et al., 2002; CANELLAS et al., 2002; JINDO et al., 2012), promovendo a despolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente a ativação de transportadores secundários, responsáveis pelo incremento da absorção de macro e micronutrientes (SONDERGAARD et al., 2004; BALDOTTO; BALDOTTO, 2014b). No trabalho realizado por Façanha et al. (2002) os autores observaram que AH extraídos de vermicomposto e de lodo de esgoto, promoveram o desenvolvimento radicular de plântulas de milho e de café e a ativação da H⁺-ATPase de membrana plasmática.

Alguns trabalhos verificaram incremento no teor dos nutrientes em diferentes culturas na presença de SHs, como o realizado por Baldotto *et al.* (2009), os quais observaram que a aplicação de AH de vermicomposto em abacaxizeiro incrementou em 52, 71, 50, 58, 60% os conteúdos de N, P, K, Ca e Mg, quando comparados com os do tratamento controle. Também no trabalho realizado por Turkmen et al. (2004) avaliando os efeitos de doses crescentes de N (0, 250, 500, 750 mg kg⁻¹) e de AH (0, 500, 1000, 2000 mg kg⁻¹) sobre o teor de nutrientes em alface, observaram influência significativa do AH no teor de N foliar, sendo o tratamento com 250 mg kg⁻¹ N e 2.000 mg kg⁻¹ de AH o que proporcionou maior conteúdo de N nas folhas. E por Al-Taey et al. (2019) que estudando o efeito conjunto de doses de AH e fertilizante bacteriano (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azospirillum*) em plantas de brócolis (*Brassica oleracea* L. var. *Itálica*) também verificaram aumento do teor de N nas plantas. Os autores Silva (2001) e Meirelles et al., (2017) observaram incremento no teor foliar de K à adição de SHs no cultivo de alface no sistema hidropônico e convencional, respectivamente.

Na tabela abaixo é possível verificar diferenças significativas entre as fontes de AH para todos os teores de micronutrientes em ambos os ciclos, com exceção do boro (B) no 2º ciclo de cultivo (Tabela 9).

Tabela 9 - Teores de micronutrientes de plantas de alface em função da aplicação de fontes e doses de ácidos húmicos em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020)

ÁCIDOS HÚMICOS	B (mg kg ⁻¹)		Cu (mg kg ⁻¹)		Fe (mg kg ⁻¹)		Mn (mg kg ⁻¹)		Zn (mg kg ⁻¹)	
	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo	1º ciclo	2º ciclo
AHex	21 a	15	11 a	8 a	197 a	152 a	85 b	62 b	51 b	37 a
AHc	20 b	15	9 b	7 b	175 b	143 b	92 a	65 a	52 a	34 b
DMS	0,40	0,49	0,41	0,32	1,22	1,05	1,28	0,98	0,98	0,77
F fonte	15,58**	0,01 ^{ns}	44,00**	24,36**	1310,25**	312,48**	124,28**	50,82**	4,61*	52,93**
F dose	4,13**	3,46 ^{ns}	2,85*	2,71*	331,16**	75,70 ^{ns}	24,84**	16,31 ^{ns}	38,84**	8,84 ^{ns}
F (Dose x fonte)	4,52**	9,33 ^{ns}	5,74**	4,76**	190,54**	243,26 ^{ns}	33,26**	82,61 ^{ns}	10,49**	11,11 ^{ns}
C.V.	3,30	5,44	7,08	7,47	1,12	1,21	2,47	2,64	3,25	3,72

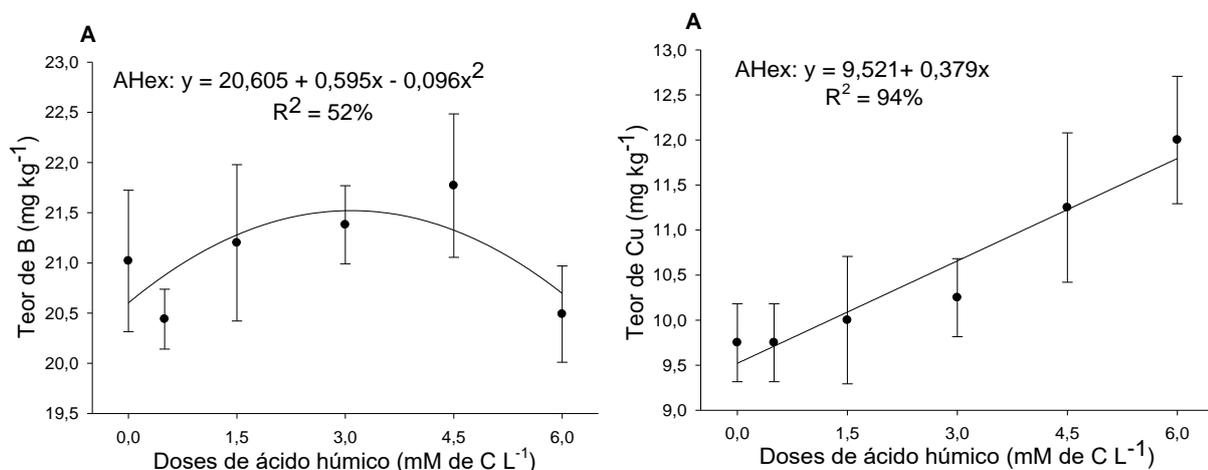
Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância. *- significativo a 5%, **-significativo a 1% e ns- não significativo pelo teste F.

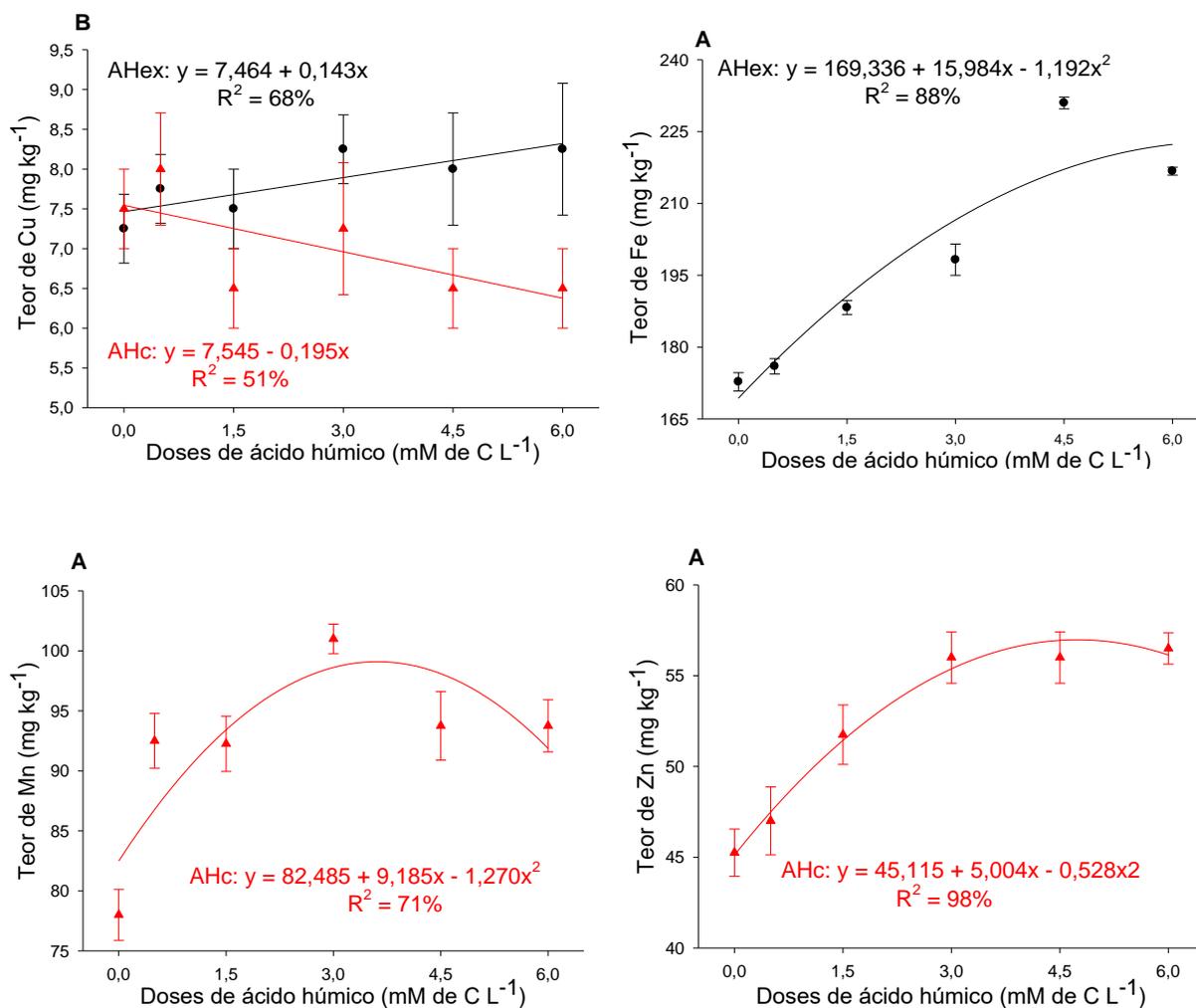
A fonte de AHc apresentou superioridade em relação a fonte de AHex para os teores de B, Cu, Fe e para o Zn no 2º ciclo, entretanto para os teores de Mn e Zn no 1º ciclo a fonte de AHex proporcionou melhor resultado em relação a fonte AHc (Tabela 9).

Pode-se observar que os teores de micronutrientes em plantas de alface apresentaram respostas diversas em função da fonte de AH utilizada, comportamento esse que pode estar relacionado com algumas características do próprio material, como o grau de purificação e o método de extração empregado. Brun et al. (1996) relatou que a técnica de extração das SHs e o uso de tratamento prévio do material original, podem elevar as quantidades de SHs geradas, além de alterar a qualidade do material obtido. Diante disso, é plausível obter respostas diferentes mesmo quando utilizadas a mesma espécie de planta, pois os AHs utilizados no presente trabalho são de materiais de origem diferentes (lodo de esgoto e leonardita) e o método de extração e de purificação do AHc não é conhecida, podendo ser diferente da empregada no presente trabalho.

Respostas significativas foram observadas para a interação entre as fontes e as doses de AH para os teores de B, Cu, Fe, Mn e Zn (Figura 6).

Figura 6 - Análise de regressão das interações entre doses e fontes de ácido húmico para os teores de B, Cu, Fe, Mn e Zn de plantas de alface cultivadas em sistema hidropônico (Botucatu-SP, 2020) (AHex. ácido húmico extraído. AHc. ácido húmico comercial. A. 1º ciclo. B. 2º ciclo)





Para os teores de B e Fe, verificou-se interação significativa entre a fonte de AHex e suas concentrações, apresentando elevação nos teores até a dose de 4,5 mM de C L⁻¹, esse resultado também foi observado para o teor de Zn em função da utilização da fonte de AHc. No caso do Mn, a resposta positiva para a absorção do elemento se deu até a concentração de 3,0 mM de C L⁻¹ de AHc, sendo possível verificar que ambos os nutrientes apresentaram decréscimo quando submetidos as concentrações mais elevadas de AHs, independente da fonte utilizada (Figura 6).

Em relação ao teor de Cu em ambos os ciclos, contrário do verificado para os outros elementos supracitados, as maiores concentrações do AHex não afetaram a absorção desse elemento pelas plantas de alface, o qual exibiu comportamento linear em função do aumento das doses. Já para a fonte de AHc verificou-se um decréscimo linear em função do aumento das doses no 2º ciclo de cultivo, sugerindo a hipótese de que a fonte de AH pode influenciar diretamente na absorção desse elemento (Figura 6).

A promoção do crescimento das plantas no solo e em soluções nutritivas, está diretamente relacionada a interferência das SHs na solubilidade de micronutrientes (CHEN; AVIAD, 1990), a qual estimula a captação de íons através da relação com a atividade da superfície dessas substâncias, que interfere na permeabilidade da membrana (CHEN et al., 1996). Entretanto, as influências das SHs na solubilidade dos minerais parecem ser variáveis e seletivas, dependendo do tipo e concentração dessa substância, das espécies de plantas, da composição e pH do meio (CHEN; AVIAD, 1990; CLAPP et al. 2001; NARDI et al. 2002) e das diferentes frações dessas substâncias, as quais parecem afetar de forma diferente na absorção pela planta (MARINO et al., 2008).

Como observado no presente trabalho as concentrações mais elevadas de AHs podem ocasionar redução do teor de alguns micronutrientes avaliados nas plantas de alface, possivelmente em razão de uma menor absorção desses elementos pelas plantas, podendo afetar no seu crescimento e desenvolvimento. Chen et al. (1994) observaram diminuição no peso de brotos e raízes de melão com concentrações elevadas de SHs originada de um extrato aquoso de esterco de gado. Resultado semelhante foi obtido utilizando ácido fúlvico à solução nutritiva, o qual proporcionou incremento no peso da raiz e do caule de plantas de pepino até uma determinada concentração, ocorrendo uma diminuição para essas variáveis nas concentrações posteriores (CHEN et al., 1996). No trabalho de Ayuso et al. (1996) os autores observaram queda no rendimento da cevada em concentrações elevadas de SHs e atribuíram à formação de complexos organometálicos de alta massa molar, o que gerou diminuição da concentração de micronutrientes em solução nutritiva, podendo ter dificultado sua absorção pela planta.

3.4 CONCLUSÃO

A fonte de ácido húmico extraído a partir de lodo de esgoto quando aplicada a solução nutritiva proporcionou incremento no teor de clorofila *a* e carotenoides, número de folhas, diâmetro do caule e nos teores de N, K, B, Cu e Fe de plantas de alface, sendo a maioria das respostas positivas visualizadas nas menores concentrações. O ácido húmico comercial influenciou positivamente as seguintes variáveis: teor de clorofila *a*, massa fresca e seca da parte aérea, volume radicular e nos teores de K, Mn e Zn de plantas de alface cultivadas em solução nutritiva.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. Nutrition of greenhouse vegetable in NFT and hydroponic systems. **Acta Horticulturae**, 361. p 254-257, 1994.
- ADANI, F.; GENEVINI, P.; ZACHEO, P.; ZOCCHI, G.. The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. **J. Plant Nutr.**, 21, 561–575. 1998.
- AL-TAEY, D. K. A.; AL-SHAREEFI, M. J. H.; MIJWEL, A. K.; AL-TAWAHA, A. R.; AL-TAWAHA, A. R.. The beneficial effects of bio-fertilizers combinations and humic acid on growth, yield parameters and nitrogen content of broccoli grown under drip irrigation system. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, 25(5), 959–966, 2019.
- ATIYEH, R. M.; LEE, S.; EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q.; METZGER, J. D.. The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. **Bioresour Technol.** 84(1): 7-14. 2002.
- AYUSO, M.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; PASCUAL, J. A. Stimulation of barley growth and nutrient absorption by humic substances originating from various organic materials. **Bioresources and Technology**, v. 57, n. 3, p. 251-257, 1996.
- AYUSO, M.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; PASCUAL, J. A.. A comparative study of the effect on barley growth of humic substances extracted from municipal wastes and from traditional organic materials. **J Sci Food Agric**, 72:493–500, 1997.
- AZAN, F.; MALIK, K. A., Effect of humic acid on seedling growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) under different conditions, **Pakistan Journal of Botany**, v. 14, p. 47-48, 1982.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.. Adventitious rooting on the Brazilian red-cloak and sanchezia after application of indole-butyric and humic acids. **Horticultura Brasileira**, 32:426-431. 2014a.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R.. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33:979-990. 2009.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GONTIJO, J. B.; OLIVEIRA, F. M.; GONÇALVES, J.. Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. **Ciência Rural**, 44:830-833. 2014.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; SOARES, R. R.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A.. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. **Revista Ceres**, 59:476-483. 2012.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; SOARES, R. R.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A.. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. **Revista Ceres**, 59:476-483. 2012.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.. Ácidos húmicos. **Revista Ceres**, v. 61, Suplemento, p. 856-881, 2014b.

BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.. Gladiolus development in response to bulb treatment with different concentrations of humic acids. **Revista Ceres**, 60:138-142. 2013.

BALDOTTO, M. A.; ROSA, R. C. C.; CANELLAS, L. P.; RANGEL, T. P.; SALOMÃO, M. S. M. B.; REZENDE, C. E.. Capacidade de oxidação como índice de estabilidade da matéria orgânica de sedimentos de acordo com gradiente fluvial-estuarino do Rio Paraíba do Sul. **Química Nova**, 34:973-978. 2011.

BASSO, S. M. S. **Caracterização morfológica e fixação biológica de nitrogênio de espécies de Adesmia DC. E Lotus L.** 1999. 268 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999.

BARBOSA, J. C; MALDONADO JUNIOR, W. **AgroEstat - sistema para análises estatísticas de ensaios agrônômicos.** Jaboticabal – SP, FCAV/UNESP. 396p, 2015.

BARCELOS, M. E. F.. **EFEITO DE ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DO LODO DE ESGOTO, SOLO DE MANGUEZAL E VERMICOMPOSTO EM *Zea mays* L.** 2015. 66 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais. Vitória-ES. 2015.

BETTONI, M. M.; MOGOR, A. F.; PAULETTI, V.; GOICOECHEA, N.; ARANJUELO, I.; GARMENDIA, I.. Nutritional quality and yield of onion as affected by different application methods and doses of humic substances. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 51, p. 37-44, 2016.

BORCIONI, E., MOGOR, A. F. PINTO, F.. Aplicação de ácido fúlvico em mudas influenciando o crescimento radicular e produtividade de alface americana. **Revista de Ciência Agrônômica**, 47, 509-515. 2016.

BRONICK, C. J.; LAL, R.. Soil structure and management: a review. **Geoderma** 124:3–22. 2005.

BRUN, G.; EZELIN, K.; KAEMMERER, M.; REVEL, J. C.. Effect of Humic Matters Extracted From Compost and From Leonardite on P Nutrition of Rye-grass. In: BERTOLDI, M.; SEQUI, P.; LEMMES, B.; PAPI, T.. (eds) **The Science of Composting**. Springer, Dordrecht, pp. 1091-1093. 1996.

CACCO, G.; ATTINÀ, E.; GELSOMINO, A.; SIDARI, M.. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. **J. Plant Nutr. Soil Sci.** 163, 313–320. 2000.

CALVO, P.; NELSON, L.; KLOEPPER, J. W.. Agricultural uses of plant biostimulants. **Plant Soil**, 383, pp. 3-41. 2014.

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

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, v. 1, n. 3, p. 3-14, 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** 196:15–27. 2015.

CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FACANHA, A. L.; FACANHA, A. R.. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiology**, 130:1951-1957. 2002.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.. (eds.). **Humosfera**: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campos dos Goytacazes: CCTA, UENF. p. 224-243. 2005.

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**, 153:157-166. 2008.

CASILLAS, V. J. C.; LONDOÑO, I. J.; GUERRERO, A. H.; BUITRAGO, G. L. A. Analisis cuantitativo de la aplicacion de cuatro bioestimulantes en el cultivo del rabano (*Raphanus sativus* L.). **Acta Agronomica**, Palmira, v.36, n. 2, p. 185-195, 1986.

CAVALCANTE, I. H. L.; SILVA-MATOS, R. R. S.; ALBANO, F. G.; SILVA JUNIOR, G. B.; SILVA, A. M.; COSTA, L. S.. Foliar Spray of Humic Substances on Seedling Production of Yellow Passion Fruit. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, 11, 301-304. 2013.

CHEN, Y.; AVAID, T.. Effects of humic substances on plant growth. In: MACCARTHY, P.; CAPP, C. E.; MALCOLM, R. L.; BLOOM, P. R.. (Eds.) **Humic substances in soil and crop sciences: selected readings**. Madison, American Society of America. p.161-186, 1990.

CHEN, Y.; CHEFETZ, B.; HADAR, Y.. Formation and properties of humic substance originating from composts. In: BERTOLDI, M.; SEQUI, P.; LEMMES, B.; PAPI, T.. (eds) **The Science of Composting**. Springer, Dordrecht, pp. 382-393. 1996.

CHEN, Y.; CLAPP, C. E.; MAGEN, H.. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. **Plant Nutrition and Soil Scienc**, 1089-1095, 2004.

CHEN, Y.; MAGEN, H.; RIOV, J.. Humic substances originating from rapidly decomposing organic matter: properties and effects on plant growth. In: SENESI, N.; MIANO, T. M. (eds.), **Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health**. Elsevier Science, Amsterdam, 427-445. 1994.

CLAPP, C. E.; CHEN, Y.; HAYES, M. H. B.; CHENG, H. H.. Plant growth promoting activity of humic substances. In: SWIFT, R. S.; SPARKS, K. M.. editors. **Understanding and Managing Organic Matter in Soils, Sediments and Waters**. St. Paul: International Humic Science Society, pp. 243–255. 2001.

DIAS, L. A.; SILVEIRA, P. H. A. M.; OMURA, S. S.; GARCIA, B.; OLIVEIRA, R. E. V.; PEREIRA, M. S. C.. Determinação de Teores de Clorofilas e Carotenoides em Alface, Rúcula e Cebolinha. **Braz. J. Anim. Environ. Res.**, v. 3, n. 4, p. 3100-3107, 2020.

DU JARDIN, P.. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. **Scientia Horticulturae**. 196:3–14. 2015.

ERTANI, A.; FRANCIOSO, O.; TUGNOLI, V.; RIGHI, V.; NARDI, S.. Effect of Commercial Lignosulfonate-Humate on *Zea mays* L. Metabolism. **J. Agric. Food Chem**, 59, 11940–11948, 2011.

ERTANI, A.; SCHIAVON, M.; MUSCOLO, A.; NARDI, S.. Alfalfa plant-derived biostimulant stimulate short-term growth of salt stressed *Zea mays* L. plants. **Plant and soil**, v.364, n.1-2, p.145-158, 2013.

EUROPEAN BIOSTIMULANT INDUSTRY COUNCIL. Economic overview of the biostimulants sector in Europe. <https://biostimulants.eu/publications/> Accessed 21 november 2021.

EYHERAGUIBEL, B.; SILVESTRE, J.; MORARD, P.. Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. **Bioresource Technology**, 99:4206-4212. 2008.

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

FERRERAS, L.; GOMEZ, E.; TORESANI, S.; FIRPO, I.; ROTONDO, R.. Effect of organic amendments on some physical, chemical and biological properties in a horticultural soil. **Bioresour Technol**, 97:635–640. 2006.

HAGHIGHI, M.. The effect of humic and glutamic acids in nutrient solution on the N metabolism in lettuce. **J. Sci. Food Agr.**, 92(15), 3023–3028. 2013.

HAGHIGHI, M.; SILVA, J. A. T.. Amendment of hydroponic nutrient solution with humic acid and glutamic acid in tomato (*Lycopersiconesculentum* Mill.) culture. **Soil Science and Plant Nutrition**, 59:4, 642-648. 2013.

HIREL, B.; BERTIN, P.; QUILLERÉ, I.; BOURDONCLE, W.; ATTAGNANT, C.; DELLAY, C.; GOUY, A.; CADIOU, S.; RETAILLIAU, C.; FALQUE, M.; GALLAIS, A.. Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. **Plant Physiol**, 125:1258–1270. 2001.

JINDO, K.; MARTIM, A. S.; NAVARRO, E. C.; PÉREZ-ALFOCEA, F.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C.; AGUIAR, N. O.; CANELLAS, L. P.. Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. **Plant Soil**, 353:209-220. 2012.

KARAKURT, Y.; UNLU, H.; UNLU, H.; PADEM, H.. The influence of foliar and soilfertilization of humic acid on yield and quality of pepper. **Acta Agric. Scand. Sect. B: Soil Plant Sci.** 59, 233–237. 2009.

MARINO, G.; FRANCIOSO, O.; CARLETTI, P.; NARDI, S.; GESSA, C.. Mineral content and root respiration of in vitro grown kiwifruit plantlets treated with two humic fractions. **J Plant Nutr.** 31: 1074–1090. 2008.

MEIRELLES, A. F. M.; BALDOTTO, M. A.; BALDOTTO, L. E. B.. Produtividade da alface (*Lactuca sativa* L.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos e bactérias diazotróficas, em condições de campo. **Rev. Ceres**, v. 64, n.5, p. 553-556, 2017.

MORA, V.; BAIGORRI, R.; BACAICOA, E.; ZAMARRENO, A. M.; GARCIA-MINA, J. M.. The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. **Environ Exp Bot**, 76:24–32. 2012.

MOTA, J. H.; SOUZA, R. J. S.; SILVA, E. C.; CARVALHO, J. G.; YURI, J.. Efeito do cloreto de potássio via fertiirrigação na produção de alface americana em cultivo protegido. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.25, n.3, p.542-549, 2001.

MUSCOLO, A.; Sidari, M.; Francioso, O.; Tugnoli, V.; Nardi, S.. Biological activity of humic substances is related to their chemical structure. **Soil Science Society of America Journal**, v. 71, n. 1, p. 75-85, 2007.

NARDI, S.; CARLETTI, P.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.. Biological activities of humic substances. In: HUANG, P. M.; SENESI, N.. (eds) **Biophysico-chemical processes in environmental systems**. Wiley, Hoboken. 2009.

NARDI, S.; CONCHERI, G.; DELL'AGNOLA, G.; SCRIMIN, P.. Nitrate uptake and atpase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. **Soil and Biology and Biochemistry**, 9:833-836, 1991.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A.. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, 34:11, 1527-1536. 2002.

NOMURA, E. S.; DAMATTO JUNIOR, E. R.; FUZITANI, E. J.; SAES, L. A.; JENSEN, E.. Aclimação de mudas micropropagadas de bananeira "Grand Naine" com aplicação de biofertilizante em duas estações do ano. **Revista Ceres**, v 59, 518-529. 2012.

PANUCCIO, M. R.; MUSCOLO, A.; NARDI, S.. Effect of humic substances on nitrogen uptake and assimilation in two species of *Pinus*. **J Plant Nutr**, 24:693–704, 2001.

PASSERA, C.; NICOLAO, L.; FERRETTI, M.; RASCIO, N.; GHISI, R.. Effect of humic substances of enzyme-activities of sulfate assimilation and chloroplast ultrastructure of maize leaves. **Photosynthetica**. 25, 39–45. 1991.

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**, 34:1217-1229, 2010.

PINTON, R.; CESCO, S.; IACOLETTIG, G.; ASTOLFI, S.; VARANINI, Z.. Modulation of NO₃⁻ uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Soil**, 215:155-161, 1999.

PIZZEGHELLO, D.; FRANCIOSO, O.; ERTANI, A.; MUSCOLO, A.; NARDI, S.. Isopentenyladenosine and cytokinin-like activity of different humic substances. **Journal of Geochemical Exploration**. 129:70–75. 2013.

POVERO, G.; MEJIA, J. F.; DI TOMMASO, D.; PIAGGESI, A.; WARRIOR, P.. A systematic approach to discover and characterize natural plant biostimulants. **Front Plant Sci** 7: 435. 2016.

PUGLISI, E.; FRAGOULIS, G.; RICCIUTI, P.; CAPPÀ, F.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; TREVISAN, M.; CRECCHIO, C.. Effects of a humic acid and its size-fractions on the bacterial community of soil rhizosphere under maize (*Zeamays* L.). **Chemosphere** 77:829–837. 2009.

QUAGGIOTTI, S.; Ruperti, B.; Pizzeghello, D.; Francioso, O.; Tugnoli, V.; Nardi, S.. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 398, p. 803-813, 2004.

RAUTHAN, B. S.; SCHNITZER, M.. Effect of a soil fulvic acid on the growth and nutrient content of cucumber (*Cucumis sativus*) plants. 1981. **Plant and Soil**, v. 63, n. 3, p. 491-495, 1981.

REGO, M. C. A. R.; COSTA, B. P.; SAMPAIO, M. C.; KASHIWAQUI, M. M.; CAETANO, J. H. S.; GUIMARAES, V. F.; DE HERRERA, J. L.; COUTINHO, P. W. R.; TSUTSUMI, C. Y.; CRUZ, M. S. F. V.; ALVES, T. N.; OLIVEIRA, S. S.; RISTAU, A. C. P.; BRAZ, H.. Production of Lettuce Seedlings with Association of Diazotrophic Bacteria and Humic Acids. **American Journal of Plant Sciences**.9, 946-957. 2018.

ROCHA, L. D.. **Ácidos húmicos extraídos do lodo de esgoto sanitário e seus efeitos em plantas**. 2014. 42p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória. 2014.

ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M.V.; VAHL, L. C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E. S.; LEAL, O. A.. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 33:959-967, 2009.

- 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: practical implications for agriculture. D. S. Sparks (Ed.), **Advances in Agronomy**, Vol. 124, pp. 37-89. 2014.
- SAJID, M.; RAB, A.; SHAH, S. T.; JAN, I.; HAQ, I.; HALEEMA, B.; ZAMIN, M.; ALAM, R.; ZADA, H.. Humic acids affect the bulb production of onion cultivars. **African Journal of Microbiology Research**, 6, 5769-5776. 2012.
- SILVA, A. C.; CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; DOBBSS, L. B.; AGUIAR, N. O.; FRADE, D. O. R.; REZENDE, C. E.; PERES, L. E. P.. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 35:1609-1617. 2011.
- SILVA, R. M.. **Produção e qualidade da alface hidropônica cultivada com adição de substâncias húmicas**. 2001. 186 f. Tese (Doutorado em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.
- SILVA, R. M.; JABLONSKI, A.; SIEWERDT, L.; SILVEIRA JÚNIOR, P.. Desenvolvimento das raízes do azevém cultivado em solução nutritiva completa, adicionada de substâncias húmicas, sob condições de casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 29:1623-1631. 2000.
- SONDERGAARD, T. E.; SCHULZA, A.; PALMGREN, M. G.. Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H⁺-ATPase. **Plant Physiology**, 136:2475-2482, 2004.
- STREIT, N. M.; CANTERLE L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. As clorofilas: revisão bibliográfica. **Ciência Rural**, versão 35, n.3, 2005.
- TAIZ, L.; ZIEGLER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, p.693. 2004.
- TAWATA, N.. **Determinação de carotenoides em alimentos brasileiros in natura processados e preparados para a tabela nacional de composição de alimentos**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. 2010.
- TREVISAN, S.; FRANCIOSO, O.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S.. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. **Plant Signaling & Behavior**, v. 5, n. 6, p. 635-643, jun. 2010.
- TREVISAN, S.; PIZZEGHELLO, D.; RUPERTI, B.; FRANCIOSO, O.; SASSI, A.; PALME, K.; QUAGGIOTTI, S.; NARDI, S.. Humic substances induce lateral root

formation and expression. of the early auxin responsive IAA19 gene and DR5 synthetic element in *Arabidopsis*. **Plant Biology**, 12:604-614. 2010b.

TURKMEN, O.; BOZKURT, M. A; YILDIZ, M.; ÇIMRIN, K. M.. Effects of nitrogen and humic acid applications on the head weight, nutrient and nitrate contents in lettuce. **Advances in Food Sciences**. Volume 26. Nº 2. 2004.

VACCARO, S.; ERTANI, A.; NEBBIOSO, A.; MUSCOLO, A.; QUAGGIOTTI, S.; PICCOLO, A.; NARDI, S.. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 2, 5. 2015.

VELASCO, J.; AGUIRRE, G.; ORTUÑO, N.. Humus líquido y microorganismos para favorecer la producción de lechuga (*Lactuca sativa* var. Crespa) en cultivo de hidroponia. **J. Selva Andina Biosph.** 4(2):71-83. 2016.

VIACAVA, G. E.; GONZALEZ-AGUILAR, G.; ROURA, S. I.. Determination of phytochemicals and antioxidant activity in butterhead lettuce related to leaf age and position. **Journal of Food Biochemistry**. 38, 352–362. 2014.

VISSER, S. A.. Physiological action of humic substances on microbial cells. **Soil Biology and Biochemistry**, 17:457-462,1985.

ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R.. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H⁺ pumps activation. **Planta** 225:1583–95. 2007.

ZHANG, X.; SCHMIDT, R. E.. Hormone-containing products' impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1344-1349, 2000.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho mostram que o lodo de esgoto (LE) pode ser uma nova fonte de matéria-prima para obtenção de substâncias húmicas (SHs), por apresentar alto teor de C em sua composição, entretanto deve-se salientar a importância da escolha do método de extração dessas frações húmicas, pois esses métodos podem gerar resultados distintos ainda que utilizando a mesma fonte de matéria-prima, como ocorreu no presente trabalho.

O uso da fração de ácido húmico (AH) (extraído de LE “in natura”) comparado com a fonte de AH comercial (extraído de leonardita) em plantas de alface no sistema de cultivo convencional e hidropônico, mostraram resultados satisfatórios tanto do uso do LE como matéria-prima para obtenção de AH, quanto a aplicação dessa fração húmica no solo e em solução nutritiva.

Apesar de o presente trabalho ter alcançado resultados positivos com a utilização de AHs de diferentes fontes, maiores investigações são necessárias a respeito das concentrações a serem utilizadas de cada produto e as espécies de plantas, pois as respostas à aplicação de SHs não são análogas, podendo ter interferência de vários fatores, como as concentrações, matéria-prima, grau de purificação, método de extração que foi empregado e as espécies de plantas.

REFERÊNCIAS

- BAI, H.; WEI, S.; JIANG, Z.; HE, M.; YE, B.; LIU, G. Pb (II) bioavailability to algae (*Chlorella pyrenoidosa*) in relation to its complexation with humic acids of different molecular weight. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 167, 1–9, 2019.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GONTIJO, J. B.; FERNANDA, M. O.; GONÇALVES, J.. Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. **Ciência Rural**, vol. 44, núm. 5, pp. 830-833. 2014.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; SOARES, R. R.; MARTINEZ, H. E. P.; VENEGAS, V. H. A.. Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. **Revista Ceres**, 59:476-483. 2012.
- BALDOTTO, L. E. B.; OLIVARES, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Structural interaction between GFP-labeled diazotrophic endophytic bacterium *Herbaspirillum seropedicae* RAM10 and pineapple plantlets 'Vitória'. **Brazilian Journal of Microbiology**, 42:114-125, 2011.
- BETTIOL, W. Effect of sewage sludge on the incidence of corn stalk rot caused by *Fusarium*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, n. 1, p. 16-22, 2004.
- BETTONI, M. M.; MÓGOR, A. F.; KOGERASTKI, J. F.; PAULETTI, V. Onion (*Allium cepa* L.) Seedling Growth using Humic Substancesidesia, v. 34. pp. 57–62, 2016.
- BOWSZYS, T.; WIERZBOWSKA, J.; BOWSZYS, J.; BIENIEK, A. Modifications in the content of available zinc and copper in soil fertilized with bio-waste compost. **Journal of Elementology**, v. 14, n. 1, p. 33–42, 2009.
- CABANISS, E. S.; Z, Q.; MAURICE, A. P.; CHIN, Y.; AIKEN, R. G. A Log-Normal Distribution Model for the Molecular Weight of Aquatic Fulvic Acids. **Environ. Sci. Technol.** V.34, 1103-1109, 2000.
- CACCO, G., ATTINÀ, E., GELSOMINO, A., SIDARI, M.. Effect of nitrate and humic substances of different molecular size on kinetic parameters of nitrate uptake in wheat seedlings. **J. Plant Nutr.** Soil Sci. 163, 313–320, 2000.
- CANELLAS L. P.; OLIVARES F. L. Physiological responses to humic substances as plant growth promoter. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**, 1:03-14, 2014.
- CANELLAS, L. P.; OLIVARES, F. L.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; FAÇANHA, A. R. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. **Plant Physiol.** v. 130, p. 1951–1957, 2002.
- CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; RUMJANEK, V. M.; MORAES, A. A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesq. Agropec. Bras.**, 36: 1529-1538, 2001.

CANELLAS, L. P.; SILVA, S. F.; OLK, D. C.; OLIVARES, F.L. Foliar Application of Plant Growth-Promoting Bacteria and Humic Acid Increase Maize Yields. **Journal of Food, Agriculture e Environment**. 13, 146-153, 2015.

CANELLAS, L. P.; SPACCINI, R.; PICCOLO, A.; DOBBS, L. B.; OKOROKOVA-FAÇANHA, A. L.; SANTOS, G. A.; OLIVARES, F. L.; FAÇANHA, A. R. Relationships between chemical characteristics and root growth promotion of humic acids isolated from Brazilian Oxisols. **Soil Sci**. v. 174, p. 611–624, 2009.

CATOLICO, A. C. C.; CARVALHO, L. C. G.; JARQUE, N. A. Aproveitamento de resíduos do saneamento básico na fabricação de cerâmica vermelha. **XI Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 11, n. 9, p. 79-96, 2015.

CHRISTL, I.; KRETZSCHMAR, R.. Relating ion binding by fulvic and humic acids to chemical composition and molecular size. 1. Proton binding. **Environ Sci Technol** 35:2505–2511, 2001.

GERKE, J. Solubilization of Fe (III) from humic-Fe complexes, humic/Fe-oxide mixtures and from poorly ordered Fe-oxide by organic acids-consequences for P adsorption. **Z. Pflanzenernähr. Bodenk.** 156, 235–257, 1993.

GULSER, F.; SONMEZ, F.; BOYSAN, S. Effects of calcium nitrate and humic acid on pepper seedling growth under saline condition. **Journal Environ. Biol.** v.31, p. 873–876, 2010.

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

KAISER, W. M.; HUBER, S. C. Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiology relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany**, v.52, n.363, p.1981-1989, 2001.

KEELING, A. A.; MCCALLUM, K. R.; BECKWITH, C. P.. Mature green waste compost enhances growth and nitrogen uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) and oilseed rape (*Brassica napus* L.) through the action of water-extractable factors. **Bioresour. Technol.** 90, 127–132, 2003.

LOPES, M. C. **Doses de lodo de esgoto na produtividade e qualidade dos frutos de abacateiro 'hass'**. 2018. 89 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia-Horticultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, 2018.

MASINI, J. C.; ABATE G.; LIMA, E. C. Comparison of methodologies for determination of carboxylic and phenolic groups in humic acids. **Analytica Chimica Acta, Amsterdam**, v. 364, p. 223-233, 1998.

MENG, F., YUAN, G., WEI, J., BI, D., OK, Y. S., Wang, H. Humic substances as a washing agent for Cd-contaminated soils. **Chemosphere**, 181, 461-467, 2017.

MORA, V.; BACAICOA, E.; ZAMARREÑO, A. M.; AGUIRRE, E.; GARNICA, M.; FUENTES, M.; GARCIA-MINA, J.M.. Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate-related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. **J. Plant Physiol.** 167, 633–642, 2010.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; GESSA, C.; FERRARESE, L.; TRAINOTTI, L.; CASADORO, G. A low molecular weight humic fraction on nitrate uptake and protein synthesis in maize seedlings. **Soil Biol. Biochem.** 32, 415–419, 2000.

NARDI, S.; PIZZEGHELLO, D.; MUSCOLO, A.; VIANELLO, A. Physiological effects of humic substances on higher plants. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 11, p. 1527-1536, 2002.

OSMAN, A. S.; RADY, M. M. Ameliorative effects of sulphur and humic acid on the growth, antioxidant levels, and yields of pea (*Pisum sativum* L.) plants grown in reclaimed saline soil. **J. Hortic. Sci. Biotechnol.** v.87, p. 626–632, 2012.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. A novel understanding of humus chemistry and implications in soil science. **Adv Agron**, v. 75, p. 57–134, 2002.

PICCOLO, A., NARDI, S., CONCHERI, G. Structural characteristics of humic substances as related to nitrate uptake and growth regulation in plant systems. **Soil Biol. Biochem.** 24, 373–380, 1992.

PINTON, R.; CESCO, S.; DE NOBILI, M.; SANTI, S.; VARANINI, Z. Water-and pyrophosphate-extractable humic substances fractions as a source of iron for Fe-deficient cucumber plants. **Biology and fertility of soils**, v. 26, n. 1, p. 23-27, 1997.

PINTON, R.; CESCO, S.; SANTI, S.; AGNOLON, F.; VARANINI, Z. Water extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fedeficient cucumber plants. **Plant and Soil**, v. 210, n. 2, p. 145-157, 1999.

QUAGGIOTTI, S., RUPERTI, B., PIZZEGHELLO, D., FRANCIOSO, O., TUGNOLI, V., NARDI, S. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). **J. Exp. Bot.** 55, 803–813, 2004.

RADY, M. M.; EL-MAGEED, T. A. A., ABDURRAHMAN, H. A., MAHDI, A. H. Humic acid application improves field performance of cotton (*Gossypium barbadense* L.) under saline conditions. **J. Anim. Plant Sci.** v. 26, p. 487–493, 2016.

RODDA, M. R. C.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R.; ZANDONADI, D. B.; GUERRA, J. G. M.; ALMEIDA, D. L.; SANTOS, G. A.. Estímulo no crescimento e na hidrólise de ATP em raízes de alface tratadas com humatos de vermicomposto: I -

efeito da concentração. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 30, n. 4, p. 649-656, 2006.

ROSA, C. M.; CASTILHOS, R. M. V.; VAHL, L. C.; CASTILHOS, D. D.; PINTO, L. F. S.; OLIVEIRA, E. S.; DOS ANJOS LEAL, O. Efeito de substâncias húmicas na cinética de absorção de potássio, crescimento de plantas e concentração de nutrientes em *Phaseolus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 4, p. 959-967, 2009.

SAITO, B; SECKLER, M. M. Alkaline extraction of humic substances from peat applied to organic-mineral fertilizer production. **Braz. J. Chem. Eng.**, 31, pp. 675-682, 2014.

SANTOS, N. M., ACCIOLY, A. M. A., NASCIMENTO, C. W. A., SANTOS, J. A. G., SILVA, I. R.. Humic acids and activated charcoal as soil amendments to reduce toxicity in soil contaminated by lead. **Rev. Bras. Ci. Solo** 38, 345–351, 2014.

SILVA, A. C.; CANELLAS, L.P.; OLIVARES, F.L.; DOBBS, L.B.; AGUIAR, N.O.; FRADE, D.A.R.; REZENDE, C.E.; PERES, L.E.P. Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p. 1609-1617, 2011.

STEVENSON, F.J. **Humus chemistry: Genesis, composition, reactions**. 2.ed. New York, John Willey, 496p, 1994.

TAVARES, O. C. H.; LANTOS, L. A.; FERREIRA, L. M.; SPERANDIO, M. V. L.; ROCHA, J. G.; GARCÍA, A. C.; DOBBSS, L. B.; BERBARA, R. L. L.; DE 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. **Ann. Appl. Biol.** 170, 89–103, 2016.

TOMASI, N.; MONTE, R.; RIZZARDO, C.; VENUTI, S.; ZAMBONI, A.; CESCO, S.; PINTON, R.; VARANINI, Z.. Effects of water-extractable humic substances on molecular physiology of nitrate uptake in two maize inbred lines with different nitrogen use efficiency. **Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium**. 2009.

VACCARO, S., ERTANI, A., NEBBIOSO, A., MUSCOLO, A., QUAGGIOTTI, S., PICCOLO, A., NARDI, S. Humic substances stimulate maize nitrogen assimilation and amino acid metabolism at physiological and molecular level. **Chem. Biol. Technol. Agric.** 2, 5, 2015.

WIECZOREK, J.; FRĄCZEK, K. Assessment of possibility of agricultural use of municipal sewage sludge generated in selected small sewage treatment plants from Kraków district. **Journal of Ecological Engineering**, v. 14, n.2, p. 36–42, 2013.

ZAMBONI, A., ZANIN, L., TOMASI, N., AVESANI, L., PINTON, R., VARANINI, Z., CESCO, S.. Early transcriptomic response to Fe supply in Fe-deficient tomato plants is strongly influenced by the nature of the chelating agente. **BMC Genomics** 17, 35, 2016.

ZANIN, L., TOMASI, N., RIZZARDO, C., GOTTARDI, S., TERZANO, R., ALFELD, M., JANSSENS, K., DE NOBILI, M., MIMMO, T., CESCO, S.. Iron allocation in leaves of Fe- deficiente cucumber plants fed with natural Fe complexes. **Physiol. Plant.** 154, 82–94, 2015.

ZANIN, L., TOMASIA, N., ZAMBONIB, A., SEGAB, D., VARANINIB, Z., PINTONA, R. Water-extractable humic substances speed up transcriptional response of Maize roots to nitrate. **Environmental and Experimental Botany.** 147, 167–178, 2018.