

Ácidos húmicos

Marihus Altoé Baldotto¹, Lílian Estrela Borges Baldotto²

<http://dx.doi.org/10.1590/0034-737X201461000011>

RESUMO

Qual é a estrutura molecular das substâncias húmicas? Ainda não foi possível encontrar a resposta. Há muita controvérsia e pouco consenso sobre as estruturas dessas substâncias. Destacam-se dois pontos principais: o acúmulo de informações e os desafios metodológicos. Esta revisão objetivou reunir informações sobre a natureza dos ácidos húmicos e suas funções nos ecossistemas naturais e agrários, visando ao manejo e à conservação, bem como às oportunidades tecnológicas para o desenvolvimento de novos insumos para a agricultura tropical.

Palavras-chave: matéria orgânica do solo, substâncias húmicas, manejo e conservação de ecossistemas naturais e agrários.

ABSTRACT

Humic acids

The molecular structures of the humic substances are still not known. There is much controversy and little consensus on the structural conception of these substances. Two main issues are considered: the accumulation of experiences and the methodological challenges. This review aimed to gather information on the nature of humic acids and their roles in natural and agrarian ecosystems, seeking their management and conservation, as well as technological opportunities for the development of new inputs for tropical agriculture.

Key words: soil organic matter, humic substances, management and conservation of natural and agrarian ecosystems.

Recebido para publicação em 10/07/2014 e aprovado em 30/10/2014.

¹ Engenheiro-Agrônomo, Doutor. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal, Rodovia LMG 818, Km 06, 35690-000, Florestal, Minas Gerais, Brasil. marihus@ufv.br (autor para correspondência).

² Engenheira-Agrônoma, Doutora. Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Viçosa, *Campus* Florestal, Rodovia LMG 818, Km 06, 35690-000, Florestal, Minas Gerais, Brasil. lilian.estrela@ufv.br

A MATÉRIA ORGÂNICA DO SOLO E A ESTABILIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Os solos são meios biológicos ricos em micro-organismos. Cada quilograma de um solo fértil pode conter 500 bilhões de bactérias (cerca de 100 vezes a população de seres humanos da Terra), 10 bilhões de actinomicetos e cerca de 1 bilhão de fungos. A essa biomassa microbiana pode-se acrescentar a contribuição das raízes, cujo comprimento pode ultrapassar 600 km no primeiro metro superior do perfil. Ainda, a considerar, existe a fauna, que pode atingir 500 milhões de seres por quilograma de solo (Sposito, 2008).

Os microrganismos desempenham papel fundamental nos solos, especialmente no ciclo do carbono e na gênese das substâncias húmicas. Os exsudados liberados pelos micro-organismos e pelas raízes das plantas contribuem para o estabelecimento da atividade de prótons e de elétrons da solução do solo e, também, para a reciclagem dos elementos-traço do solo. Dos exsudados, os ácidos orgânicos fórmico, acético, oxálico, tartárico e cítrico aparecem entre os mais caracterizados. O próton do grupamento carboxílico desses ácidos (COOH) pode dissociar-se facilmente, na faixa normal de pH dos solos. Os prótons dissociados podem agir sobre os minerais do solo, provocando sua decomposição. O ânion carboxilato (COO⁻) remanescente pode formar complexos solúveis com cátions metálicos resultantes do intemperismo (Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2011a). A concentração total de ácidos orgânicos na solução do solo varia de 0,01 a 5 mmol L⁻¹, valor bastante elevado quando comparado com a concentração de metais traço (= 1 μmol L⁻¹). A meia-vida desses ácidos no solo é muito curta (horas, talvez), sendo eles, entretanto, continuamente produzidos pelos micro-organismos e, ou, excretados pelas raízes. Além desses ácidos orgânicos alifáticos, a solução do solo contém ácidos aromáticos, cuja unidade estrutural básica é constituída pelo anel benzênico, no qual grupamentos carboxílicos (ácidos benzeno-carboxílicos) ou hidroxílicos (ácidos fenólicos) podem estar ligados de várias maneiras. A concentração desses ácidos na solução do solo varia de 0,05 a 0,3 mmol L⁻¹ (Baldotto *et al.*, 2008a; Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2010a).

Uma classe especial de ácidos orgânicos são os aminoácidos, cuja concentração na solução do solo ocorre tipicamente na faixa de 0,05 a 0,6 mmol L⁻¹. Alguns dos aminoácidos mais abundantes nos solos são a glicina, a alanina, o ácido aspártico, o ácido glutâmico, a arginina e a lisina. Dada a presença do grupamento NH₂, os aminoácidos podem perfazer mais da metade do N dos húmus do solo, e podem combinar-se para formar

peptídeos. As proteínas são, portanto, polímeros, ou, mais especificamente, polímeros de condensação de aminoácidos. Peptídeos de composição e estruturas variadas constituem as formas dominantes de aminoácidos nos solos. Esses peptídeos acumulam-se, tipicamente, como complexos com coloides orgânicos e inorgânicos (Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2010a; Baldotto *et al.*, 2013).

Os carboidratos constituem outra importante classe de biopolímeros. Esses compostos, que podem representar até metade do carbono orgânico dos solos, em geral, apresentam estrutura em anel, com arranjo de hidroxilas e grupamentos substituintes característicos, como glicose, galactose, manose, xilose, ácido galacturônico e glucosamina. Os monossacarídeos, por sua vez, polimerizam-se para formar polissacarídeos. Assim, por exemplo, duas unidades de glicose podem sofrer condensação para formar a unidade repetitiva celulose. A celulose é, portanto, um polímero de condensação de glicose e pode representar até 20% do carbono orgânico do solo. Os fenóis constituem uma importante classe de álcoois fracamente ácidos. O álcool coníferico, exemplo de fenol, polimeriza-se para formar lignina. Lignina e celulose, juntas, representam importantes precursores das substâncias húmicas do solo (Baldotto *et al.*, 2008a; Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2010a), como será visto posteriormente.

Além de elevada ciclagem de N pelo húmus, como já mencionado para os aminoácidos, outros nutrientes são estreitamente dependentes das transformações da matéria orgânica do solo. Além do K, que permanece na forma iônica livre, nas células, sendo liberado logo que os materiais orgânicos frescos chegam ao solo, os compostos orgânicos de P podem chegar a 80% do total no solo e ocorrem, principalmente, na forma de inositol fosfato. Os sais de Ca e de Mg do ácido fítico são conhecidos por fitina, sendo importantes na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas. Os compostos orgânicos contribuem para a maior fração do S no solo, na forma de S-aminoácidos, fenóis e polissacarídeos. A dinâmica dos micronutrientes no solo também é altamente dependente das reações de humificação (Baldotto *et al.*, 2008a; Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2010a).

ENTÃO, O QUE SÃO SUBSTÂNCIAS HÚMICAS?

Assim que materiais orgânicos frescos chegam ao solo, os micro-organismos formam biofilmes e sintentizam seu complexo enzimático, para iniciarem a decomposição do novo substrato. A matéria orgânica fresca, num ecossistema, pode ser representada pela serapilheira ou liteira, comumente designada horizonte

O. Nesse material, pode-se distinguir macroscopicamente a origem dos resíduos, ou seja, identificar folhas, galhos, exoesqueletos de insetos, etc. Logo abaixo, no perfil do solo, observa-se a coloração escurecida do húmus. O húmus é constituído de biomoléculas (como as descritas anteriormente) e de substâncias húmicas. As biomoléculas, com identidade bioquímica definida, poderão sofrer transformações, em um ambiente ecologicamente adequado e gerar substâncias que não apresentam mais identidade bioquímica, sendo uma massa escurecida, remanescente da decomposição do material orgânico. Abaixo do O está o horizonte A. Em ambos os horizontes, O e A, há predominância de características adquiridas dos materiais da biosfera, enquanto que nos subjacentes predominam características genéticas (horizonte B) e características herdadas do material originário (horizonte C). O solo maduro tem equilíbrio entre as características adquiridas, herdadas e genéticas.

Havendo apropriada disponibilidade de nutrientes (especialmente relação C/N adequada) haverá atividade microbiana e transformação da matéria orgânica, ocorrendo, após determinado tempo, a estabilização biológica, pois o resíduo tornar-se-á energeticamente desfavorável à obtenção de nutrientes para o crescimento microbiano. Em seguida, o resíduo remanescente, não totalmente convertido a CO₂, com diversidade de grupos funcionais, deverá estabilizar-se quimicamente, após a reação dessas unidades orgânicas entre si. Será iniciada, também, a estabilização física, culminando com a agregação das subunidades orgânicas na supramolécula. Essa é uma descrição genérica da humificação, processo do qual poucos detalhes se conhecem, mas cujas etapas biológica, química e física podem ser inferidas.

Em termos simples, pode-se dizer que as substâncias húmicas são compostos orgânicos condensados, produzidos pela ação microbiana, e que diferem dos biopolímeros por sua estrutura molecular e elevada persistência no solo. Essa definição de substâncias húmicas é, portanto, desvinculada do conhecimento exato de forma e massa molecular. Os processos bioquímicos envolvidos na formação do húmus ainda não são bem entendidos. Existem pouco consenso e muitas dúvidas em relação ao processo genericamente definido como humificação (Baldotto *et al.*, 2010a).

As entidades que se afirmam padronizadoras de metodologias para o estudo das substâncias húmicas (Canellas & Santos, 2005), como a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014), debatem, principalmente, duas concepções para essas substâncias: macromoléculas ou supramoléculas. Ambas as concepções apresentam evidências e bases teóricas para a sua postulação.

Os trabalhos de Schnitzer & Khan (1972), Kononova (1982), Stevenson (1994) e de Camargo *et al.* (1999) apresentam evidências e concepções estruturais macromoleculares para as substâncias húmicas e o número 11, do volume 164, da revista Soil Science foi dedicado ao tema, com destaque para as defesas de Clapp & Hayes (1999) para esse modelo (Canellas & Santos, 2005). O modelo explica a reatividade das substâncias húmicas e, portanto, dá sustentação à discussão da maioria dos dados experimentais comumente obtidos nas áreas de química do solo e ambiental. Contudo, se, em relação aos grupos funcionais e às reações de superfícies, há relativo consenso e aceitação do modelo macromolecular, com relação à estrutura e conformação, o assunto é controverso. Stevenson (1994) descreve a gênese, a composição e as reações químicas do húmus com base no modelo macromolecular (Canellas & Santos, 2005).

Wershaw & Aiken (1985) e Wershaw (1993) conceberam o modelo estrutural para as substâncias húmicas do tipo micelar, com uma parte hidrofóbica, voltada para o interior, e uma parte hidrofílica, voltada para o exterior (Canellas & Santos, 2005). Piccolo (2001) reuniu evidências sobre um arranjo supraestrutural para explicar a estrutura dessas substâncias. Assim, à luz do modelo supramolecular, as substâncias húmicas vêm sendo conceituadas como agregados supramoleculares, organizados em assembleias de diversos compostos orgânicos de baixa massa molecular, contendo domínios predominantemente hidrofílicos (ácidos fúlvicos - AF), ou hidrofílico-hidrofóbicos (ácidos húmicos). A separação analítica pode ser feita (IHSS, 2014), por meio da ionização com extratores alcalinos, que permite solubilizar ambos os grupos, ao contrário, a acidificação promove a precipitação, apenas, da fração ácidos húmicos, que apresenta caráter menos polar que a fração AF. Nos sistemas naturais, ocorre uma mistura desses domínios. Na concepção supramolecular, esses agregados húmicos são mantidos em solução por pontes de hidrogênio e por interações hidrofóbicas que, isoladamente são ligações fracas, mas, somadas, podem fornecer forte estruturação a essas substâncias e, assim, resultar numa apenas aparente alta massa molecular. O termo huminas refere-se à fração orgânica insolúvel, remanescente da extração dos ácidos húmicos e fúlvicos. Sutton & Sposito (2005) somaram contribuições à nova visão da estrutura molecular das substâncias húmicas, concebida por Piccolo (2001).

À luz do modelo supramolecular, as substâncias húmicas mantêm-se agregadas por meio de forças de interação fracas, como as de *van der Waals* e outras ligações hidrofóbicas, em pH neutro, e de pontes de hidrogênio, em valores mais baixos de pH. Esse modelo

possibilita, macroscopicamente, prever que as macromoléculas húmicas formam colóides e, microscopicamente, fazer previsões sobre microcosmos químicos (agregados), os quais, como será inferido adiante, possibilitarão ajustar a humificação aos parâmetros da termodinâmica, bem como justificar a ação direta sobre receptores celulares que desencadeiam algumas das respostas fisiológicas das substâncias húmicas (Canellas & Santos, 2005; Baldotto *et al.*, 2010a).

DEFINIÇÃO OPERACIONAL DE ÁCIDOS HÚMICOS

As características e propriedades das substâncias húmicas são, frequentemente, investigadas após o fracionamento da matéria orgânica. A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014) propõe o fracionamento químico, o qual, por sua vez, leva à definição operacional para as frações que compõem as substâncias húmicas (*e.g.*, ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, huminas). O fracionamento químico da matéria orgânica é baseado nas características de solubilidade das substâncias húmicas e encontra-se detalhadamente descrito na página da Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014) e em Canellas & Santos (2005).

Em resumo, ao se tratar o extrato alcalino com HCl concentrado, até pH~1, força-se a precipitação da fração de massa molecular, relativa e aparentemente mais elevada, a dos ácidos húmicos. A fração das substâncias húmicas que permanece solúvel representa os ácidos fúlvicos, que são compostos por moléculas de massa molecular aparente mais baixa que a dos ácidos húmicos e com maior conteúdo de grupos funcionais ácidos. Por fim, as substâncias que não são extraídas do solo representam a fração humificada, fortemente ligada à fração mineral do solo, denominada humina. Os ácidos húmicos, fúlvicos e as huminas podem, então, ser classificados com base na solubilidade em meio ácido ou alcalino. A solvatação dos grupos funcionais, extraídos com solução de base forte diluída, é devida ao mecanismo de repulsão eletrostática das cargas negativas presentes nos grupos funcionais ácidos da estrutura molecular das substâncias húmicas. Esses grupos funcionais são dissociados no valor de pH da solução extratora (geralmente entre 11 e 13).

As substâncias húmicas extraídas do solo apresentam, normalmente, uma quantidade elevada de impurezas inorgânicas (que podem chegar, em alguns casos, até a 50%), que devem ser eliminadas antes dos estudos de caracterização. No caso dos ácidos húmicos, objetos desta revisão, uma redução considerável dessas impurezas inorgânicas é obtida por meio de redissoluções e

reprecipitações sucessivas, modificando-se o pH da suspensão. Particularmente eficiente é o tratamento do extrato com solução diluída da mistura de ácidos clorídrico e fluorídrico. Depois, a suspensão é tratada com uma resina de troca de cátions na forma protonada, reduzindo-se o teor de cinzas a menos de 1%. Na sequência, a diálise elimina íons remanescentes do processo de extração e purificação. Baldotto (2006) verificou teores de cinzas tolerados pela IHSS, mesmo com o relativamente exaustivo método de isolamento e purificação, contendo, entre outros metais, Fe, Si, Cu, observados pela análise de energia dispersiva de raios-X, em microscópio eletrônico de varredura, indicando, ao mesmo tempo, que o método possibilita isolar as substâncias húmicas dentro da faixa de controle tolerável, mas com a presença de substâncias que devem ser levadas em consideração na interpretação de resultados analíticos.

Se a investigação das estruturas moleculares das substâncias húmicas constitui, no atual estágio de pesquisa, uma área bastante difícil, não sendo possível, até agora, descrever as configurações moleculares das substâncias húmicas fracionadas, a composição elementar e os grupamentos funcionais dessas substâncias (especialmente aqueles que apresentam maior reatividade com prótons, elétrons, íons metálicos e pesticidas) têm sido, entretanto, razoavelmente bem caracterizados (Stevenson, 1994; Baldotto *et al.*, 2005; Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2013). Adverte-se, entretanto, que o estudo das características químicas da matéria orgânica humificada requer o seu isolamento do ambiente natural. Situações complexas, quando reduzidas à simplificação, podem gerar modelos abstratos demais para explicar o real. As substâncias húmicas existem no ecossistema como um *continuum* da transformação do ciclo do carbono na Terra e não, provavelmente, como substâncias discretas com estrutura molecular definida (Piccolo, 2001; Canellas & Santos, 2005).

Após o fracionamento químico, os ácidos húmicos e fúlvicos constituem as duas substâncias húmicas mais estudadas. Suas composições médias no solo são $C_{135}H_{182}O_{95}N_5S_2$, para os ácidos fúlvicos, e $C_{187}H_{186}O_{89}N_9S$, para os ácidos húmicos (Schnitzer & Khan, 1972).

Essas fórmulas químicas médias podem ser comparadas com a média da razão molar C|N|P|S da matéria orgânica do solo, que é 278:17:1:1, e com a “fórmula de Redfield” para a composição química média de plantas aquáticas, que é $C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$. Dessas fórmulas médias, depreende-se que, com relação à matéria orgânica do solo, os ácidos húmicos e fúlvicos aparecem empobrecidos em N. A relação molar C/N desses ácidos é cerca de 50% maior que a da matéria orgânica do solo, indicando a maior resistência dessas substâncias húmicas

à mineralização microbiana. Se comparados com os organismos vivos e com as biomoléculas (representados pela fórmula de Redfield), os ácidos húmicos e fúlvicos aparecem enriquecidos em C e empobrecidos em H e N. O empobrecimento em N indica, outra vez, a ausência de compostos susceptíveis à mineralização por meio da biodegradação. O decréscimo de H, de uma razão molar em torno de 2:1 H/C, no material biológico, para próximo de 1:1, nas substâncias húmicas, sugere que estas possuem um maior grau de insaturação. Esse fato é consistente com o caráter mais aromático das substâncias húmicas que, assim, tenderiam a resistir ao ataque microbiano. Além disso, as fórmulas médias indicam que a massa molecular média dos ácidos húmicos é maior que a dos ácidos fúlvicos.

As composições química e de grupos funcionais médias dos ácidos húmicos e dos ácidos fúlvicos (Schnitzer & Khan, 1972) revelam que os ácidos húmicos apresentam mais C e menos O que os ácidos fúlvicos, mostrando que o ácido húmico é relativamente mais polimerizado que o ácido fúlvico e que os ácidos fúlvicos contêm mais grupamentos funcionais ácidos, por unidade de massa, que os ácidos húmicos. A relação entre as frações ácidos húmicos e ácidos fúlvicos, por exemplo, constitui-se num índice de estabilidade da matéria orgânica (Baldotto, 2006; Ribas *et al.*, 2008).

Aspectos estruturais dos ácidos húmicos têm sido obtidos por métodos químicos clássicos e espectroscópicos. A Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS, 2014), Canellas & Santos (2005) e Santos *et al.* (2008), reúnem informações sobre ácidos húmicos, isolados de diversos ecossistemas, de trabalhos realizados em diferentes países. Em Dobbss *et al.* (2009), encontram-se o fracionamento da matéria orgânica, o isolamento das substâncias húmicas e a caracterização química e espectroscópica de Latossolos modais brasileiros. Nesses trabalhos, os métodos químicos e espectroscópicos dão sustentação ao uso da aromaticidade e da alifaticidade, que se relacionam com a hidrofiliabilidade e hidrofobicidade. Nesse sentido, nas duas principais e mais citadas concepções de estrutura e conformação, para as substâncias húmicas (macromolecular ou supramolecular), aceita-se relativamente bem que os polímeros fenólicos, resultantes da decomposição da matéria orgânica, sejam convertidos para compostos contendo anéis benzênicos oxigenados (quinonas), bastante reativos e de fácil condensação.

Tossel (2009) verificou que espécies de quinonas oxidadas e reduzidas participam da agregação das substâncias húmicas de forma estável, convergindo para a teoria dos arranjos supramoleculares das substâncias húmicas, apresentada por Piccolo (2001), permitindo

inferir que a atração entre quinonas doadoras e receptoras de elétrons possa ser computada entre as forças que mantêm essas associações. Em concordância, os grupos quinonas foram indicados, por Scott *et al.* (1998), Lovley *et al.* (1996; 1998), Struyk & Sposito (2001) e Baldotto *et al.* (2007; 2008b), como os principais responsáveis pela atividade redox das substâncias húmicas nos sistemas naturais. De acordo com o mecanismo indicado pelos autores, radicais livres semiquinonas podem ser formados quando grupos quinonas, presentes nas substâncias húmicas, são reduzidos, permanecendo estáveis no ambiente. Os grupos semiquinonas podem ser reduzidos a hidroquinonas, ainda mais estáveis. Por outro lado, grupos fenólicos contidos nas substâncias húmicas podem sofrer oxidação e formar radicais semiquinonas (Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007).

A concentração dos grupos funcionais quinônicos aumenta com o avanço da estabilização química das substâncias húmicas, pela policondensação e pela conjugação de estruturas insaturadas (Milori *et al.*, 2002; Budziak *et al.*, 2004; Rivero *et al.*, 2004). Essa estabilização pode ser estimada pelo aumento da concentração de radicais livres do tipo semiquinonas (CRLS), determinados por ressonância paramagnética eletrônica (RPE) (Schnitzer & Levesque, 1979; Martin-Neto *et al.* 1994a, b; Martin-Neto *et al.*, 1998; Milori *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004; Busato *et al.*, 2009). A CRLS das substâncias húmicas também vem sendo associada a suas interações com metais e pesticidas (Schwarzenbach *et al.*, 1990; Tratnyek & Macalady, 2000; Martin-Neto *et al.* 1994b), pois a maioria desses processos envolve mecanismos de transferência de elétrons. Os radicais livres do tipo semiquinonas das substâncias húmicas são grupos doadores de elétrons e podem ser oxidados, pelo iodo (I_2), nas titulações redox iodimétricas (Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007; 2008b).

Como a emissão de CO_2 para a atmosfera ou a permanência do C nos solos e águas podem ser vistos como resultados das reações de oxidação e redução da matéria orgânica, a eletroquímica fornece indicativos da sua estabilidade nesses sistemas (Stumm & Morgan, 1996; Shang & Tiessen, 1997; Baldotto *et al.*, 2007; 2008b; 2009a; Sposito, 2008) e, certamente, garante, também, informações importantes para fundamentar modelos conceituais de estrutura e conformação das substâncias húmicas. Ainda mais, as propriedades termodinâmicas da matéria (e.g., variação de energia livre de Gibbs, constante de equilíbrio condicional, potencial redox, capacidade redox, etc.) continuarão sendo uma “assinatura”, ou “impressão digital” (*finger print*) para as substâncias húmicas, independentemente do modelo conceitual proposto no passado, no presente ou no futuro.

PROPRIEDADES TERMODINÂMICAS E “FINGER PRINT” DOS ÁCIDOS HÚMICOS

Como visto, a concentração e as características químicas dos ácidos húmicos, por sua sensibilidade a alterações no sistema, têm sido escolhidos para a avaliação da reatividade da matéria orgânica humificada, no ambiente, que será governada pela qualidade e quantidade de grupos funcionais presentes em sua estrutura (Kononova, 1982; Thurman & Malcon, 1981; Stevenson, 1994; Stumm & Morgan, 1996; Zech *et al.*, 1997; Piccolo *et al.*, 1999; Lal, 2001; Piccolo, 2001, Sutton & Sposito, 2005; Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2007; 2008b) e, ou, pela sua capacidade de proveniência de substâncias bioativas (Canellas *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2008a; Baldotto *et al.*, 2009b). Assim, dentre as características das substâncias húmicas que governam a sua reatividade nos sistemas naturais, destaca-se a sua participação em reações redox (Matthiessen, 1995; Lovley *et al.*, 1996; 1998; Scott *et al.*, 1998; Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007; 2008a, b; 2009a; 2010a; 2011a,b; 2013), possibilitando, então, por meio da eletroquímica, a determinação de suas propriedades termodinâmicas (Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007; 2008b; 2009a; 2010a; 2011a,b; 2013), visando a melhor comparar, manejar e monitorar sistemas naturais e agrários. Adicionalmente, como nas regiões tropicais, os solos encontram-se, frequentemente, em estágio avançado de intemperismo, apresentando argilas de baixa atividade, elevados teores de óxidos de Fe e de Al e, algumas vezes, caráter ácrico, a avaliação qualitativa dos estoques de matéria orgânica por meio da eletroquímica pode contribuir para a previsão da geração e do monitoramento de cargas negativas.

As titulações redox permitem estimar o potencial formal padrão do eletrodo (${}^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$) e a capacidade de oxidação (COx), fatores de intensidade e de capacidade da atividade de elétrons, respectivamente, análogos ao pH e à capacidade de neutralização ácida, para o caso de prótons. As titulações redox consistem na oxidação das substâncias húmicas com I_2 (iodimetria), sob atmosfera inerte (Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2005; 2007; 2008b; 2009a; 2010a; 2011a,b; 2013). O sistema de titulação é montado, utilizando-se um frasco, fechado com tampa adaptada para conter um eletrodo, um tubo para entrada de gás argônio e uma microbureta. O sistema é termostatizado por meio de um banho em recirculação, mantido a 25 °C. Baldotto *et al.* (2007) detalham o procedimento experimental e a análise dos dados dessas titulações.

Como será discutido a seguir, sendo o potencial redox uma propriedade termodinâmica qualitativa da

matéria, o fator intensidade, é coerente com sua constância, conferindo às substâncias húmicas uma “impressão digital” e indicando que, a despeito das diferenças genéticas das diversas amostras, é válido o estudo do húmus como uma substância química de identidade própria. Possibilita, por exemplo, o monitoramento da poluição, pois cada substância química apresenta um valor de potencial distinto. O nítido ponto de inflexão revela a predominância de um grupo doador. Nesse sentido, a variação da COx resulta da diferente concentração desse grupo funcional doador de elétrons, como abordado na sequência.

Os dados das titulações redox dos ácidos húmicos isolados de compostos orgânicos, solos e sedimentos de águas interiores, estuarinas e oceânicas, por Struyk & Sposito (2001) e por Baldotto *et al.* (2007; 2008b; 2009a; 2011a,b; 2013) revelaram f.e.m._{cela} semelhantes e, observou-se, também, a sua diminuição média em 40 mV função do aumento do pH de 5 para 7 (Tabela 1).

A equação de redução das substâncias húmicas indica que a fem_{cela} varia inversamente com o pH do sistema redox. Todas as amostras dos trabalhos citados transferiram ao $I_{2(aq)}$, na reação de oxidação, aproximadamente um próton para cada três elétrons, ou seja, a relação q/n apresentou valor de cerca de 0,33. Considerando-se a reação redox entre AH_{Red} e I_2 , com a relação q/n de aproximadamente 1/3 de H^+ por e^- transferido, os resultados dos trabalhos indicam que o par redox $AH_{\text{Ox}}, AH_{\text{Red}}$ resulta na reação de redução genérica dependente do pH:



Os valores do ${}^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$, estimados nos trabalhos usados nesta revisão (Tabela 1) foram semelhantes. Dessa forma, as demais propriedades redox (K , pE e ΔG°), calculadas a partir do ${}^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$, também pouco se alteraram, entre os trabalhos avaliados e, como já mencionado, são propriedades eletroquímicas termodinâmicas que constituem a “impressão digital ou assinatura” das substâncias húmicas. Pode-se inferir que a reação de redução (Eq. 1) é termodinamicamente favorecida nas condições de sistemas naturais (valor negativo de ΔG°).

De acordo com Helburn & MacCarthy (1994), os ácidos húmicos apresentaram ${}^{\text{F}}E_{\text{H}}^{\circ}$ e $\log K_c$ análogos aos de compostos de quinona reduzida. Contudo, os ácidos húmicos apresentaram mais ampla relação q/n que a verificada nos grupos quinona: ~ 0,33 e ~ 1,00, respectivamente.

A matéria orgânica constitui a principal fonte de elétrons para as reações de oxirredução (redox) no solo. Os principais elementos químicos envolvidos nas reações redox, nesses sistemas, são C, N, O, S, Mn e Fe. Nos solos contaminados por metais pesados, pode-se, ainda, acrescentar As, Se, Cr, Hg e Pb. Muitas interações

entre os ácidos húmicos e poluentes ocorrem, portanto, por meio de reações redox. Além disso, os processos de redução e oxidação (redox) são responsáveis pelas trocas de carbono entre as geosferas (litosfera, pedosfera, hidrosfera, atmosfera, biosfera), ou seja, pelo próprio balanço de carbono nos ecossistemas, e constituem processos de redução (fixação, fotossíntese) e oxidação (respiração). Baldotto *et al.* (2005) reúnem informações sobre as trocas de carbono entre as geosferas, levando em consideração os estoques de carbono e sua estabilidade em diferentes ecossistemas.

Uma comparação entre os valores de alguns pares redox comuns nos sistemas naturais, realizada por Struyk & Sposito (2001) e por Baldotto *et al.* (2007), consistiu em alocar a equação de redução do par AH_{Ox} , AH_{Red} na “sequência redox” (Tabela 2) indicada por Stumm & Morgan (1996).

Os valores semelhantes das propriedades redox dos ácidos húmicos, dos estudos supracitados, permitem as mesmas inferências, quanto à sua reatividade nos sistemas naturais. Assim, termodinamicamente, os ácidos húmicos podem reduzir Hg(II) e Mn(IV). Essas reduções foram observadas experimentalmente por Alberts *et al.* (1974) e Sunda & Kieber (1994), respectivamente, incubando esses íons metálicos com bactérias redutoras e ácidos húmicos, confirmando-se as previsões termodinâmicas.

Nos sistemas naturais, contudo, as implicações ambientais e biogeoquímicas das reações redox, envol-

vendo os ácidos húmicos e os produtos formados, ainda não se encontram bem descritas (Stumm & Morgan, 1996; Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007, 2008b; 2009a, b; 2010a; 2011b; 2013). Essas descrições tornam-se fundamentais para a discussão de resultados, como os apresentados por Almeida *et al.* (2007), que encontraram uma variação entre 93 e 290 $\mu\text{g kg}^{-1}$ nas concentrações de Hg dos sedimentos do Rio Paraíba do Sul, cujos picos de maior e de menor concentração desse elemento foram determinados em novembro de 1999 e em agosto de 2000, respectivamente. Esses picos coincidem com aqueles de alta e baixa vazão, respectivamente e, também, foram acompanhados pelas épocas de maior e de menor atividade redox da matéria orgânica isolada desses sedimentos, no estudo de Baldotto *et al.* (2009a). Amostras de material orgânico, isoladas de sedimento de oceano profundos, na bacia petrolífera de Campos dos Goytacazes-RJ, podem também ser avaliadas por meio de propriedades termodinâmicas obtidas com titulações redox (Baldotto *et al.*, 2013). De forma análoga, o método proposto foi também usado por Carvalho *et al.* (2013). A determinação das propriedades termodinâmicas, além de permitir identificar a “assinatura” dos ácidos húmicos e verificar sua presença nesses ecossistemas especiais, possibilita o monitoramento de perturbações, uma vez que a incorporação de poluentes modificará essa “impressão digital”.

Para complementar a predição da atividade das espécies oxidada e reduzida de ácidos húmicos (AH_{Ox} , AH_{Red})

Tabela 1. Média e amplitude de propriedades¹ redox dos ácidos húmicos

f.e.m. _{cela}		q/n	$^{\circ}E_{H}$	log K_c	pE_c (pH7)	ΔG°
pH5	pH7					
			V			kcal mol ⁻¹
457 (450 a 472)	420 (411 a 432)	0,32 (0,25 a 0,34)	0,777 (752 a 794)	13,1 (12,7 a 13,4)	10,8 (10,7 a 11,1)	-17,9 (-17,3 a -18,3)

⁽¹⁾ f.e.m._{cela} = força eletromotriz da cela, q/n = relação entre prótons e elétrons transferidos, $^{\circ}E_{H}$ = potencial redox formal, K_c = constante condicional de equilíbrio, pE_c = potencial de elétrons condicional e ΔG° = variação de energia livre de Gib na equação geral de redução dos ácidos húmicos ($AH_{Ox} + e^{-} + H^{+} = AH_{Red}$); Dados de Matthiessen (1995), Struyk & Sposito (2001) e Baldotto *et al.* (2007; 2008b; 2009a) A descrição da obtenção das variáveis está detalhada em Baldotto *et al.* (2007).

Tabela 2. Propriedades redox de alguns pares comuns em sistemas naturais

Pares redox	$^{\circ}E_{H}$	log K_c	pE_c ⁽¹⁾
	V		(pH7)
$\frac{1}{2} MnO_2 (s) + 2 H^{+} + e^{-} = \frac{1}{2} Mn^{2+} (aq) + H_2O$	1,23	20,8	6,8
$Fe(OH)^{+} (aq) + e^{-} + H^{+} = Fe^{2+} (aq) + H_2O$	0,90	15,2	8,2
$Hg^{2+} (aq) + e^{-} = Hg^{\circ} (g)$	0,85	14,4	14,4
$AH_{Ox} (s/aq) + 1/3 H^{+} + e^{-} = AH_{Red} (s/aq)$	0,77	13,0	10,9
$FeOOH (s) + e^{-} + 3 H^{+} = Fe^{2+} (aq) + 2 H_2O$	0,77	13,0	-4,0
$Fe^{3+} (aq) + e^{-} = Fe^{2+} (aq)$	0,77	13,0	13,0

⁽¹⁾ Os valores de pE foram calculados, usando-se os valores de log K_c , concentração de redutores e oxidantes = 10^{-4} mol L⁻¹ de espécies solúveis, atividade das fases sólidas iguais a 1 e $P_{O_2} = 0,21$ atm (Stumm & Morgan, 1996). Os valores em negrito são as médias dos dados compilados para o par redox dos ácidos húmicos (AH) (Matthiessen, 1995; Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007; 2008b; 2009a; 2011b; 2013).

nos sistemas naturais, introduziram-se os dados compilados (Tabelas 1 e 2) no diagrama $pE = f(pH)$, adaptado de Bartlett & James (1993) e Bass Becking *et al.* (1960), conforme Baldotto *et al.* (2007). O diagrama (Figura 1) indicou que os ácidos húmicos poderiam atuar nas reações redox, nesses sistemas.

De acordo com o diagrama, por exemplo, os ácidos húmicos podem atuar na redução de espécies de Mn(IV), como mostraram Sunda & Kieber (1994), e o resultado dos trabalhos de Lovley *et al.* (1996; 1998) e de Scott *et al.* (1998) podem ser discutidos. Esses resultados indicaram a participação dos ácidos húmicos na redução de Fe(III) a partir da fase sólida, como, por exemplo, goethita (FeOOH). Observa-se, contudo, que a redução dessa espécie por ácidos húmicos não é termodinamicamente favorável. Como o par redox Fe^{2+} , FeOOH está abaixo do par redox AH_{Ox} , AH_{Red} , entre os valores de pH 5 e 7, as espécies FeOOH e AH_{Red} poderiam coexistir predominantemente no sistema, ou seja, segundo os dados apresentados, se a redução de Fe(III), a partir da fase sólida, acontece, deve, então, haver “input” externo de energia, pois essa reação ocorreria contra a tendência termodinâmica. Assim, é possível que, após a redução

microbiológica, os ácidos húmicos apresentem um potencial abaixo daqueles compilados neste estudo, em titulações na ausência de catálise. Como a catálise é esperada e os trabalhos apresentam resultados divergen-

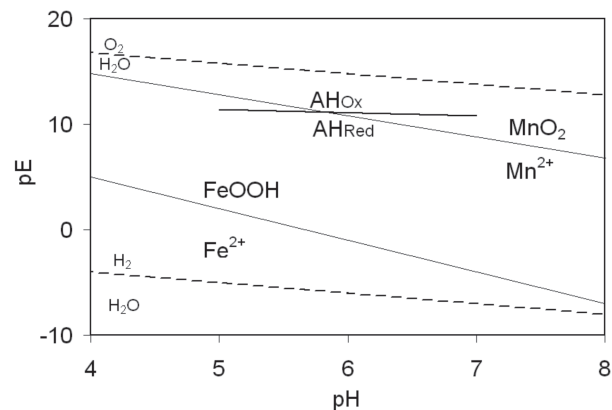


Figura 1. Diagrama $pE = f(pH)$, mostrando alguns pares redox comuns em sistemas naturais e a média dos dados compilados para o par redox dos ácidos húmicos (AH_{Ox} , AH_{Red}) (Matthiessen, 1995; Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007; 2008b; 2009a; 2011b; 2013). Adaptada de Bartlett & James (1993) e de Baldotto *et al.* (2007).

Tabela 3. Aplicação de ácidos húmicos em plantas ornamentais

Nome científico (nome vulgar)	Estrutura propagativa usada na aplicação de AH	Fonte de AH	Dose de máxima eficiência física da variável analisada	Variável analisada na dose de MEF; incremento relativo (IR) ¹ em relação ao controle (sem aplicação de AH)	Referência bibliográfica
<i>Cymbidium</i> sp. (orquídea cymbidium)	Mudas propagadas <i>in vitro</i>	Cama-de-frango	18,75 mmol L ⁻¹ C	Matéria seca total; IR= 21%	Baldotto <i>et al.</i> (2014)
<i>Cymbidium</i> sp. (orquídea cymbidium)	Mudas propagadas <i>in vitro</i>	Esterco bovino	3,77 mmol L ⁻¹ C	Matéria seca total; IR = 28%	Baldotto <i>et al.</i> (2014)
<i>Codianium variegatum</i> (cróton)	Estacas caulinares	Vermicomposto	14,41 mmol L ⁻¹ C	Matéria seca da raiz; IR = 4%	Baldotto <i>et al.</i> (2012)
<i>Gladiolus</i> sp. (gladiolo, palma-de-Santa-Rita)	Bulbos	Vermicomposto	16,48 mmol L ⁻¹ C	Matéria fresca dos bulbos; IR = 50%	Baldotto & Baldotto (2013)
<i>Helianthus annuus</i> (girassol ornamental)	Sementes	Vermicomposto	37,80 mmol L ⁻¹ C	Número de hastes florais, IR = 52%	Baldotto & Baldotto (2014b)
<i>Hibiscus rosa-sinensis</i> (hibisco)	Estacas caulinares	Vermicomposto	49,91 mmol L ⁻¹ C	Matéria seca da raiz; IR = 15%	Baldotto <i>et al.</i> (2012)
<i>Sanchezia nobilis</i> (sanquésia)	Estacas caulinares	Vermicomposto	19,58 mmol L ⁻¹ C	Matéria seca da raiz; IR = 36%	Baldotto & Baldotto (2014c)

¹ IR = 100 (x-y)/y, sendo x a média do tratamento de maior valor e y a média do tratamento de menor valor.

tes, indicando a necessidade de pesquisa, buscou-se refinar o assunto na abordagem a seguir.

Por causa da baixa solubilidade dos óxidos de ferro, eles se acumulam nos solos e em sedimentos, e apresentam-se como drenos de P muito mais expressivos que as plantas (Leal & Velloso, 1973). Quer dizer que a concentração de P nos solos, entre 200 e 3.000 mg kg⁻¹, valores relativamente elevados, resulta em modais 1 mg kg⁻¹ disponíveis em Latossolos. A amplitude na solução do solo está entre 0,002 e 2 mg L⁻¹ de P. Essa indisponibilização deve-se, principalmente, às reações de adsorção entre o P e a matriz oxidada dos Latossolos e, em outros casos, às reações de precipitação entre esses solos e espécies de Al e Fe em solução.

Considerando-se a predominância, nas regiões tropicais, de solos em estágio avançado de intemperismo (Latosolos), com argilas de baixa atividade, elevados teores de óxidos de Fe e de Al, alta capacidade de adsorção de fosfatos ácidos, de baixa disponibilidade de nutrientes e, algumas vezes, apresentando caráter eletropositivo (Embrapa, 2013), a avaliação da atividade redox da matéria orgânica humificada pode contribuir para a previsão da geração de cargas negativas nesses sistemas e para seu monitoramento (Baldotto *et al.*, 2006; 2007; 2008a, b). Nesses sistemas, o P é considerado um dos nutrientes mais limitantes para a produção agrícola, pois existe forte competição entre a planta e o solo pelos íons fosfato em solução. A planta, ao absorver P, atua como dreno para este elemento, e o solo, por sua vez, também atua como dreno, ao adsorvê-lo fortemente. À medida que avança o estágio de intemperismo do solo, há grande desequilíbrio em favor do dreno solo (adsorção), em relação ao dreno planta (absorção), podendo decorrer daí que a planta não mais sustente a competição por esse elemento (Leal & Velloso, 1973). A reação de redução do Fe(III) a Fe(II) pode-se tornar de fundamental importância na biogeoquímica de sistemas naturais e, sobretudo, quando relacionada com o fenômeno de adsorção de fosfatos em solos tropicais, comumente ricos em óxidos de Fe.

Os mecanismos das reações de adsorção envolvem ligações químicas (troca de ligantes) do fosfato com a superfície dos minerais do solo, principalmente os óxidos de ferro e de alumínio. Assim, quando os íons entram em contato com a superfície dos óxidos, ocorre, inicialmente, atração eletrostática, consolidando-se, numa segunda etapa, a adsorção específica, por via da troca de ligantes, ou seja, por meio de ligações coordenadas ao óxido ligante, mono ou bidentado. Dessa forma, o P passa a fazer parte da estrutura dos óxidos (Leal & Velloso, 1973). Essa estrutura lhe confere maior estabilidade e, em consequência, menor disponibilidade para as plantas.

Em laboratório, por exemplo, a medida da capacidade máxima de adsorção de fosfatos em solos revela valores de 1 mg g⁻¹ de P, ou mais, naqueles mais argilosos e intemperizados (maior teor de óxidos de Fe e de Al), como os Latossolos. Esse valor corresponde a 1.000 mg kg⁻¹ de P ou 2.000 kg ha⁻¹ de P, ou a 4.600 kg ha⁻¹ de P₂O₅, o que leva, em termos práticos, a 23.000 kg ha⁻¹ (23 toneladas por hectare!) de superfosfato simples (fertilizante com cerca de 200 g kg⁻¹ de P₂O₅).

Em condições de campo, observam-se alterações no potencial redox de solos, como, por exemplo, sob hidromorfismo. Essas modificações nas características químicas e mineralógicas dos solos têm forte influência sobre o comportamento do P, modificando a relação entre suas formas no solo. Nesses solos, a reversibilidade da adsorção específica do P resultante da redução do Fe(III) dos óxidos leva a aumento da concentração de Fe(II) e de P em solução. Mesmo nos solos aerados, ocorrem, constantemente, microcosmos redox, na porosidade de menor diâmetro, permanentemente saturada com água. Nesse sentido, a redução de fases cristalinas de Fe pode resultar na solubilização do P previamente adsorvido.

Os mecanismos de redução microbológica de Fe da fase sólida vêm sendo estudados por trabalhos como os de Lovley *et al.* (1996; 1998); Scott *et al.* (1998); Tombácz *et al.* (2004); Peretyazhko & Sposito (2005) e Fernández *et al.* (2008a,b).

Utilizando uma quinona sintética, a antraquinona-2,6-dissulfonato (AQDS), Scott *et al.* (1998) conseguiram estimular a redução de Fe³⁺, similar à obtida com ácidos húmicos. Os micro-organismos podem conservar energia para seu crescimento por via do transporte de elétrons para o aceptor AQDS, resultando em antra-hidroquinona-2,6-dissulfonato, em estado reduzido (AHQDS), que pode, abioticamente, mediar a redução férrica, por meio da transferência de elétrons, regenerando AQDS oxidada. Quando micro-organismos são cultivados em meio contendo AQDS e Fe³⁺, também são aptos a transferir elétrons para ácidos húmicos (Lovley *et al.*, 1996; 1998). Como os ácidos húmicos podem atuar como transportadores de elétrons, entre micro-organismos e óxidos de Fe, se estes contiverem P adsorvido, após a desestabilização da estrutura, pode-se esperar um aumento da solubilização desse nutriente.

Peretyazhko & Sposito (2005) estudaram amostras de solos de florestas tropicais húmicas, em Porto Rico, e verificaram a redução de espécies sólidas de Fe(III), com aumentos das concentrações de P em solução, confirmando os dados de Lovley *et al.* (1996; 1998), Scott *et al.* (1998) e Tombácz *et al.* (2004).

Fernández *et al.* (2008a, b), entretanto, estudando a redução do solo com sacarose e ácidos orgânicos, observaram que a diminuição do potencial redox não resultou em aumento expressivo da concentração de P em solução e atribuíram os resultados à grande estabilidade dessas formas. Contudo, os autores trabalharam com solos altamente intemperizados e, dada a natureza pobre e pouco diversa em nutrientes, micro-organismos e material orgânico humificado (reductor), é provável que não tenha ocorrido a formação de biofilmes ativos, comprometendo a capacidade redox e a solubilização de fosfatos, tão dependentes de um ambiente ecologicamente equilibrado. Ora, Latossolos sob cultivo convencional, sobretudo em monocultura não são exemplos de sistemas conservacionistas.

A extensão atual desses mecanismos de redução de Fe(III) na fase sólida e de solubilização de P em ambientes naturais deve ser mais bem compreendida, pois a taxa de redução microbiana de ácidos húmicos e de Fe³⁺ não dependeria apenas da concentração de matéria orgânica e do potencial redox da presença, mas também dos micro-organismos apropriados (Struyk & Sposito, 2001; Baldotto *et al.*, 2007). Na presença de ácidos húmicos como mediadores das reações redox, o sistema integrado poderia superar as limitações impostas pela baixa solubilidade das formas mais cristalinas de ferro, aumentando a cinética de redução. As condições de pH, E_H e de concentrações de P no interior dos biofilmes microbianos (Baldotto, 2006) são muito diferentes daquelas da matriz do solo. Na ausência da biota apropriada, considerando-se os potenciais observados na Tabela 1 e interpretados com base na Figura 1, essa redução parece não acontecer. Espera-se, entretanto, que a redução enzimática, apropriadamente catalisada pelos micro-organismos, resulte na diminuição do potencial redox das substâncias húmicas, aumentando seu poder reductor. Nos biofilmes, essa atividade desses agentes pode, portanto, influenciar o campo de estabilidade das espécies químicas existentes, com condições de equilíbrio diferentes daquelas previstas em laboratório (Lindsay, 1979; Stumm & Morgan, 1996; Struyk & Sposito, 2001; Baldotto, 2006; Sposito, 2008).

De acordo com os trabalhos usados neste levantamento, a COx das substâncias húmicas varia com o pH da titulação redox e, dentro de cada valor de pH, é analogamente modificada de acordo com a origem das amostras, ou seja, o fator quantidade de elétrons transferíveis, nas condições especificadas, varia com a gênese dessas substâncias.

Matthiessen (1995), estudando amostras de ácidos húmicos sintético, encontrou valores médios de 7,5 mol_c kg⁻¹, a pH 5,0, e de 10,5 mol_c kg⁻¹, a pH 7,0. Struyk &

Sposito (2001), para ácidos húmicos isolados de amostras padrão da IHSS, determinaram valores de COx entre 1,09 e 6,50 mol_c kg⁻¹, a pH 5, e variando de 3,30 até 11,50 mol_c kg⁻¹, a pH 7. Baldotto *et al.* (2007), trabalhando com ácidos húmicos de adubos orgânicos, verificaram COx de 3,88 a 4,39 mol_c kg⁻¹, a pH 5 e de 5,35 a 7,89 mol_c kg⁻¹, a pH 7. Baldotto *et al.* (2008b), estudando ácidos húmicos obtidos de solos sob cultivo contínuo com cana-de-açúcar, submetida, ou não, à queima para a colheita ou à aplicação de vinhaça, encontraram COx variando de 1,01 a 3,44 mol_c kg⁻¹, a pH 5, e de 1,64 a 6,44 mol_c kg⁻¹, a pH 7,0. Para a matéria orgânica isolada do Rio Paraíba do Sul, nas quatro estações do ano e por dois anos sucessivos, os valores determinados por Baldotto *et al.* (2009a) variaram de 0,11 a 0,19 mol_c kg⁻¹, a pH 5, e de 0,17 a 0,32 mol_c kg⁻¹, a pH 7,0. A COx de ácidos húmicos isolados de solos modais do Estado do Rio de Janeiro (Embrapa, 1980), em diferentes estádios de intemperismo, situaram-se entre 2,69 e 6,43 mol_c kg⁻¹ (Baldotto *et al.*, 2010a) e a de Latossolos modais brasileiros, para ácidos húmicos, oscilou entre 1,0 e 2,3 mol_c kg⁻¹, a pH 5,0, e de 1,5 a 3,5 mol_c kg⁻¹, a pH 7,0 e, para AF, oscilou de 0,5 a 1,3 mol_c kg⁻¹, a pH 5,0, e de 1 a 2,5 mol_c kg⁻¹, a pH 7,0 (Dobbss *et al.*, 2009). Baldotto *et al.* (2013), estudando amostras de oceano, profundas, da bacia petrolífera de Campos dos Goytacazes-RJ, verificou COx de 0,65 a 4,94 e de 1,01 a 7,26 mmol_c kg⁻¹, a pH 5,0, e pH 7,0, respectivamente, negativamente relacionada com o aumento das isóbatas.

As variações da COx com o pH são típicas dessas reações redox que envolvem prótons e, para as substâncias húmicas, podem ser entendidas de acordo com a equação 1. Quanto às alterações químico-estruturais, modificadas de acordo com a gênese das substâncias húmicas, foram verificadas relações positivas entre a COx e a concentração de grupos funcionais fenólicos, quinonas e semiquinonas (Baldotto *et al.*, 2007; 2008b). A correlação com a concentração de grupos carboxílicos foi baixa. Esses resultados revelam uma ordem de aumento da COx com a presença de estruturas condensadas, indicadora de maior estabilidade do C no solo. Quanto à acidez carboxílica e fenólica, estudos indicam sua relação com maiores alifaticidade e aromaticidade, respectivamente (Schnitzer & Gupta, 1965; Stevenson, 1994; Sposito, 2008).

A tendência observada entre a COx e a concentração de grupos funcionais é, portanto, recomendável para o estabelecimento de modelos preditivos para os atributos químico-estruturais das substâncias húmicas, ou seja, seu grau de condensação e aromaticidade. Esses resultados convergem com as análises espectroscópicas da matéria orgânica humificada (Rovira *et al.*, 2002; Baldotto, 2006).

Nos trabalhos de Baldotto *et al.* (2007; 2008b), por exemplo, os ácidos húmicos com maior poder redutor apresentaram menor relação entre a absorvância, em 465 e 665 nm, no espectro UV-Vis (E_4/E_6), cujos valores são indicativos do seu tamanho e massa (Kononova, 1982, Chen *et al.*, 1977). Adicionalmente, a COx dos ácidos húmicos relacionou-se estreitamente com a intensidade de fluorescência, em 465 nm (IF_{465}). Essa última propriedade advém de aspectos eletroquímicos das substâncias húmicas, associados a anéis aromáticos condensados ou cadeias alquílicas insaturadas (Milorí *et al.*, 2002; Pérez *et al.*, 2004; Saab & Martin-Neto, 2003; Conte *et al.*, 2007). Milorí *et al.* (2002) e Baldotto *et al.* (2008b) verificaram que a estabilidade dos ácidos húmicos pode ser estimada por meio de modelos preditivos entre a aromaticidade, na forma de semiquinonas, e a IF_{465} .

Canellas *et al.* (2008a), estudando amostras de solos modais do Estado do Rio de Janeiro, observaram aumentos dos sinais de ressonância magnética nuclear do ^{13}C (RMN ^{13}C) dos ácidos húmicos, na região entre 112 e 220 ppm, correspondente a espécies $sp^2 C$ aromáticas ou olefinas e incluindo, também, carbonilas de quinonas. Esses maiores sinais foram correlacionados com a COx dessas amostras por Baldotto *et al.* (2010a). Observa-se aumento simultâneo do C hidrofóbico e da COx dessas amostras. A relação entre hidrofobicidade e estabilidade da matéria orgânica foi abordada por outros trabalhos (Conte *et al.*, 2007; Xiaoli *et al.*, 2007), assim como a diminuição do C alquílico foi observada em solos tropicais, na medida em que se intensificaram os processos de uso agrícola (Spaccini *et al.*, 2006).

Aumentos da COx dos ácidos húmicos e de sua aromaticidade seletiva para maior estabilidade, ou seja, suas concentrações de grupos fenólicos, quinonas e semiquinonas, indicadas, respectivamente, por ^{13}C RMN e por ressonância paramagnética de elétrons (RPE), foram verificados por Baldotto *et al.* (2008b), estudando áreas na região Norte Fluminense sob contínuo cultivo (mais de 50 anos) com cana-de-açúcar, submetida, ou não, à queima da palha para a colheita e, também, recebendo, ou não, aplicações anuais de vinhaça. Essa relação indica que a estabilidade dos estoques de C depende da direção em que seguem as suas reações de oxidação e redução, nas quais há envolvimento desses grupos funcionais aromáticos.

Dados recentes, estimados por cálculos de energia livre de reação (Tossel, 2009), mostraram que espécies de quinonas oxidadas e reduzidas formam assembleias muito estáveis, ligadas, ou não, por grupos alquil. Essas evidências, também com base em propriedades termodinâmicas a partir de métodos instrumentais (espectroscopias), corroboram os dados de eletroquímica mostrados aqui, convergindo para a teoria dos arranjos

supramoleculares das substâncias húmicas, apresentada por Piccolo (2001). Essa convergência reforça o fato de a gênese das substâncias húmicas estar associada à estabilização de quinonas e indica que a atração entre quinonas doadoras e receptoras de elétrons pode ser computada entre as forças que mantêm as associações supramoleculares.

Os processos pedogenéticos que atuam na formação dos solos são bem evidenciados pelas diferenças quantitativas e qualitativas observadas na sua fração orgânica. Os valores da COx dos ácidos húmicos isolados de solos em diferentes estádios de intemperismo por Baldotto *et al.* (2010a) e por Dobbss *et al.* (2009) relacionaram-se significativamente com o índice Ki, a atividade da argila e a fertilidade do solo. Baldotto *et al.* (2010a) observaram que os incrementos dos valores da COx dos ácidos húmicos foram, também, acompanhados de aumentos dos valores de relação ácidos húmicos/ácidos fúlvicos, teor de argila, CTC, saturação por bases e pH, com simultânea diminuição do ΔpH e da concentração de Al^{3+} dos solos. Esses resultados associam-se às características morfogenéticas dos solos, em especial à estrutura, atributo macromorfológico genético relacionado com aspectos mineralógicos, químicos e físicos dos solos. Observaram-se maiores valores de COx na seguinte sequência de predomínio estrutural: estrutura composta, com blocos grandes, formando prismas (Chernossolos) > estrutura simples, com blocos grandes (Luvisolos) > estrutura simples, com blocos pequenos (Argissolos) > blocos mal formados ou granulares (Latosolos). Nos solos muito intemperizados, como os Argissolos e o Latossolos, os ácidos húmicos apresentaram os menores valores de COx, indicando o fato de que nos solos que mais necessitam da matéria orgânica para o aumento da fertilidade, a sua quantidade e qualidade são, entretanto, inferiores (Baldotto, 2006).

No entanto, os aumentos conjuntos da fertilidade e da estabilidade da matéria orgânica foram observados por Cunha (2005), em alguns solos antropogênicos da região norte do Brasil. Nessa gênese, os Latossolos, mesmo sob ambientes favoráveis à decomposição da matéria orgânica (Amazônia), apresentaram horizonte A antrópico (Embrapa, 2013) enriquecido em matéria orgânica e bases trocáveis, com pH em torno de 6,5. A natureza da estabilização do húmus nesses sistemas ainda não foi totalmente esclarecida. Existe, contudo, razoável convergência sobre a preservação seletiva de estruturas condensadas na estrutura dos ácidos húmicos, com a estabilização de radicais livres semiquinonas e sua relação com a elevada disponibilidade de bases desses sistemas. Os resultados indicam que os efeitos de um manejo com contínua adição, bem planejada, de resíduos orgânicos e minerais e o não revolvimento do solo po-

dem estar associados aos aumentos da estabilidade da matéria orgânica nesses solos e, especialmente, que esses efeitos podem ser estudados, visando a garantir formas de manejo que assegurem aumento da fertilidade do solo, com conservação do solo.

OUTRAS REAÇÕES DOS ÁCIDOS HÚMICOS

Os principais grupamentos, em ordem decrescente de teores encontrados das substâncias húmicas, são os carboxílicos, fenólicos, quinonas, cetonas, álcoois, amino e sulfidrilas (Schnitzer & Gupta, 1965; Schnitzer & Riffaldi, 1972; Kononova, 1982; Thurman & Malcon, 1981; Stevenson, 1994; Stumm & Morgan, 1996; Zech *et al.*, 1997; Piccolo *et al.*, 1999; Lal, 2001; Piccolo, 2001; Sutton & Sposito, 2005; Sposito, 2008; Baldotto *et al.*, 2007; 2008a, b). A proeminência dos grupamentos carboxílicos e de OH-fenólicos sublinha a significativa acidez das substâncias húmicas. As substâncias húmicas apresentam carga líquida negativa, mesmo na faixa ácida de pH, que é devida, principalmente, à dissociação de grupos carboxílicos ($pK < pH$ do solo). Assim, a acidez total dos grupamentos funcionais das substâncias húmicas é, normalmente, calculada pela soma dos grupamentos carboxílicos e fenólicos. O ácido fúlvico, que contém mais grupamentos carboxílicos por unidade de massa, apresenta acidez total maior. Os ácidos húmicos e fúlvicos apresentam carga protônica dissociável, aproximadamente duas a três vezes maior, por unidade de massa, que a tipicamente verificada para as argilas silicatadas 2:1 e, estas últimas, por sua vez, apresentam densidade de carga cerca de 100 vezes maior que as argilas 1:1, como a caulinita. A acidez total dos grupamentos funcionais das substâncias húmicas, variando de 3 a 17 mol kg⁻¹, tem sido documentada para as substâncias húmicas em várias partes do mundo (nas diversas condições climáticas).

A matéria orgânica humificada do solo desempenha papel fundamental no tamponamento das concentrações de prótons e cátions metálicos. Complexos de superfície, como a troca iônica, constituem a base química para essa capacidade tampão. Os ácidos húmicos podem reagir com várias substâncias presentes nos solos, como os agrotóxicos ou pesticidas. O húmus, tanto na forma de colóides individualizados, como na forma de recobrimento de superfícies minerais, pode reagir com esses compostos e, em alguns casos, detoxificá-los de modo considerável. O húmus solúvel (como a fração ácidos fúlvicos) pode formar complexos com os compostos orgânicos, que podem, então, pela ação da água percolante, deslocar-se para as partes inferiores do perfil do solo. Os pesticidas localizados na superfície dos

solos podem ser transportados por meio desse movimento (Schwarzenbach *et al.*, 1990; Martin-Neto *et al.*, 1994a).

Grupamentos negativamente carregados dos ácidos húmicos reagem com compostos orgânicos contendo átomos de nitrogênio, em coordenação tetraédrica (nitrogênio quaternário) e apresentando carga positiva. Essas estruturas contendo N quaternário ocorrem tanto em compostos alifáticos, como em aromáticos e em heterocíclicos, estes dois últimos mais comuns nas formulações de pesticidas (Baldotto *et al.*, 2008a; Sposito, 2008).

Outros compostos orgânicos, contendo grupamentos funcionais que se tornam carregados positivamente quando protonados, podem, também, reagir com as substâncias húmicas do solo por meio de troca catiônica, *v. g.*, aminoácidos básicos contendo dois grupamentos NH₂ protonáveis, como a arginina e a lisina. As triazinas, que apresentam na estrutura NH₂ protonáveis, representam outro exemplo desses compostos. As triazinas são uma classe de herbicidas modernos, baseados na estrutura aromática simétrica, que apresenta, alternados, átomos de carbono e de nitrogênio, em um anel de seis membros. O membro mais conhecido das triazinas é a atrazina, um herbicida de tipo triazina inibidor do fotossistema II no processo de fotossíntese. Acontecem, também, reações de protonação e, portanto, de troca catiônica entre herbicidas heterocíclicos e substâncias húmicas. Um exemplo dessa reação ocorre entre o triazol (não é triazina) e substâncias húmicas (Baldotto *et al.*, 2008a; Sposito, 2008).

Mesmo na ausência de desenvolvimento de carga líquida positiva (N quaternário e NH₂ protonados), os grupamentos funcionais COOH e NH₂ podem formar pontes de hidrogênio com átomos eletronegativos, como N, O e F. A ponte de hidrogênio constitui, essencialmente, uma ligação eletrostática. O hidrogênio prende-se a um átomo por ligação covalente forte e, a outro átomo eletronegativo, por meio de ligação eletrostática. As ligações eletrostáticas são mais fracas que as covalentes. Como exemplos, o grupamento carbonila nos pesticidas tipo fenilcarbamatos (e.g., Isopropil-N-fenilcarbamato ou IPC) e ureias substituídas (e.g., Fenil-dimetil-uréia ou Fenuron) podem formar pontes de hidrogênio com o grupamento NH₂ da matéria orgânica do solo. E, ainda, nas triazinas, o grupamento NH₂ pode, também, formar pontes de hidrogênio com o grupamento carbonila do húmus. Os grupamentos funcionais das substâncias húmicas podem reagir com os minerais do solo, por meio dos mecanismos de troca catiônica e aniônica. Como anteriormente exposto, estruturas contendo N quaternário e compostos orgânicos protonáveis, existentes nas substâncias húmicas, podem formar ligações de troca

catiônica. O mecanismo de troca aniônica pode ser considerado como troca de ligantes, em que a protonação de hidroxilas favorece esse processo. A superfície hidroxilada protonada, v.g., óxidos, pode também reagir com grupos amino (R-NH₂) de substâncias húmicas. As moléculas não iônicas, que não sofrem processo de protonação ou de desprotonação para formar espécies carregadas, podem, ainda, ligar-se aos minerais do solo, em consequência da polaridade, que produz carga localizada dentro da molécula. Essa polaridade pode resultar de pontes de hidrogênio, forças de *van der Waals* e “*water bridging*”. “*Water bridging*” refere-se à complexação de um grupamento funcional das substâncias húmicas com a água, solvatando o cátion trocável. Assim, “*water bridging*” também acontece por via da ponte de hidrogênio (Baldotto *et al.*, 2008a; Sposito, 2008).

As substâncias húmicas são ligantes fortes, capazes de formar complexos estáveis com metais e outros componentes dos ecossistemas. Ligantes são íons ou moléculas que rodeiam um metal na formação de um complexo metálico. Mais genericamente, são espécies químicas que se comportam como bases de Lewis na formação de compostos de coordenação, pois dizem que estão coordenadas a determinado íon. Os ligantes simples, como a água ou o ânion cloreto, só formam uma ligação com o átomo central e, por isso, chamam-se monodentados. Alguns ligantes são capazes de formar múltiplas ligações de coordenação e são descritos como bidentados, tridentados, etc. O processo de ligação ao íon metálico por mais de uma posição de coordenação por ligante chama-se quelação. Os compostos que formam complexos desse modo chamam-se agentes quelantes, ou quelatos e, geralmente, têm muito maior tendência a formar complexos que seus homólogos monocoordenantes. Um desses agentes quelantes, de importância industrial, é o ácido etilendiaminotetracético (EDTA). À semelhança da do EDTA, a quelação de ferro resulta em aumento do (Fe³⁺) e, conseqüentemente, no seu transporte. Além de fazer parte da gênese de solos (e.g., no processo de podzolização, nos Espodosolos), esse fato traz preocupações com o caso da movimentação de metais pesados. Por outro lado, quelatos de Al³⁺ diminuem sua atividade, tendo resultados na formação dos minerais do solo (como na precipitação, ou não, de gibsitita, durante o intemperismo dos minerais), na fertilidade do solo, etc. Sabe-se, também, que alguns micronutrientes, como o Cu²⁺, têm sua atividade diminuída após a quelação. Dada a diversidade das substâncias húmicas, a estabilidade dos quelatos é um tema que necessita de mais informações sintetizadas (Baldotto *et al.*, 2008a; Sposito, 2008).

As diferentes formas de interação para formar complexos fazem dos ácidos húmicos “bioproveniências” (Sutton & Sposito, 2005), ou seja, substâncias capazes de formar microsítios contendo (“aprisionando”) diferentes moléculas, entre elas, as bioativas, como os resíduos hormonais vegetais (bioestimulantes).

BIOATIVIDADE DOS ÁCIDOS HÚMICOS

Considera-se que a decomposição dos resíduos vegetais no solo não destrua, ao menos totalmente, as suas substâncias bioativas e, ainda, possa modificá-las e, ou, gerar novas moléculas, as quais, persistiriam e se estabilizariam junto com as substâncias húmicas. Os modelos conceituais (macromolecular e supramolecular) possibilitam suportar essa hipótese e os dados experimentais fornecem indicações desse mecanismo. A propriedade da bioatividade das substâncias húmicas será abordada a seguir.

Notadamente, as substâncias húmicas alteram o desenvolvimento das plantas (Chen & Avid, 1990; Nardi *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2004). Interferem indiretamente no metabolismo vegetal, pelos efeitos ocasionados no solo, como complexação de metais, aumento da capacidade de troca catiônica, fornecimento de nutrientes e retenção de umidade (Rocha & Rosa, 2003). Atuam, também, diretamente, por influenciarem o transporte de íons, a atividade respiratória, o conteúdo de clorofila, a síntese de ácidos nucleicos e a atividade de várias enzimas (Nannipieri *et al.*, 1983). Esses efeitos das substâncias húmicas, em especial da fração bioativa dos ácidos húmicos, vêm despertando o interesse de produtores rurais e de empresas para uso no manejo de sistemas agrários e serão revisados neste trabalho.

Os ácidos húmicos atuam em diferentes níveis de organização do corpo da planta e em várias etapas envolvidas na fisiologia vegetal, como expressão de genes (Elena *et al.*, 2009), presença de organelas (Jannin *et al.*, 2012), metabolismo primário (Trevisan *et al.*, 2011), metabolismo secundário (Schiavon *et al.*, 2010), crescimento e desenvolvimento (Trevisan *et al.*, 2011) e produção de flores, frutos e sementes (Wangen *et al.*, 2013; Arancon *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2011; Baldotto & Baldotto, 2013).

Os efeitos mais relatados dos ácidos húmicos, nas plantas, estão relacionados com o sistema radicular e envolvem a formação de raízes laterais (Canellas *et al.*, 2002; Trevisan *et al.*, 2010b; Baldotto *et al.*, 2011b; Jindo *et al.*, 2012; Mora *et al.*, 2012), a formação de raízes adventícias (Baldotto *et al.*, 2012; Baldotto & Baldotto, 2014a, b, c), o alongamento radicular (Malik

& Azam, 1985; Silva *et al.*, 2000) e a formação de pelos radiculares (Canellas *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Todos esses fatores aumentam a massa radicular e a área de superfície das raízes, contribuindo para maior absorção de água e de nutrientes (Eyheraguibel *et al.*, 2008). Além dos efeitos diretos na morfologia e na fisiologia radicular, os ácidos húmicos também atuam indiretamente, alterando a química e a dinâmica microbiana da rizosfera, por estimularem a exsudação de ácidos orgânicos e de açúcares pelas raízes (Canellas *et al.*, 2008b; Puglisi *et al.*, 2013). Ao alterarem o ambiente rizosférico, os ácidos húmicos interferem nas interações solo-microbiota-planta, principalmente na disponibilidade e na assimilação de nutrientes.

A influência dos ácidos húmicos na nutrição das plantas já foi extensivamente avaliada em diferentes espécies cultivadas (Govindasmy & Chandrasekaran, 1992; Pilanal & Kaplan, 2003; Tejada & Gonzalez, 2003; Eyheraguibel *et al.*, 2008; Baldotto *et al.*, 2009b; Mora *et al.*, 2010; Ameri & Tehranifar, 2012; Jannin *et al.*, 2012). De modo geral, a aplicação de ácidos húmicos resulta em incrementos nos teores e conteúdos de macro e micronutrientes. Baldotto *et al.* (2009b), por exemplo, observaram que a aplicação de ácidos húmicos 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.

Dentre os nutrientes essenciais às plantas, está o nitrogênio (N). A assimilação de N (Quaggiotti *et al.*, 2004; Mora *et al.*, 2010), em resposta aos ácidos húmicos, está sendo estudada de forma mais detalhada. Segundo Quaggiotti *et al.* (2004), a aplicação de ácidos húmicos aumenta a absorção de nitrato (NO_3^-) pelas raízes de milho, por causa, possivelmente, da regulação da síntese de RNAm da principal H^+ -ATPase de milho, a Mha2. Jannin *et al.* (2012) também verificaram incrementos na absorção de NO_3^- e assimilação de N, em *Brassica napus*, concomitantemente à expressão de genes que codificam transportadores de nitrato.

As bases celulares e moleculares da atuação dos ácidos húmicos no sistema radicular ainda não foram elucidadas e algumas hipóteses surgiram, consolidadas em trabalhos de diferentes grupos de pesquisa. Uma delas diz respeito ao aumento verificado na solubilidade do complexo húmico-metal, que facilita a absorção principalmente de micronutrientes (Chen & Aviad, 1990; Pinton *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004). Outra diz respeito ao aumento da permeabilidade das membranas celulares, provocado pela notória ação surfactante que os ácidos húmicos apresentam. Assim, as membranas biológicas, em contato com uma solução de ácidos húmicos, teriam sua permeabilidade aumentada e, conseqüentemente, a entrada de íons e a nutrição celular seriam faci-

litadas (Visser, 1985). Uma terceira hipótese seria a de estímulo e, ou, inibição das mais diversas atividades enzimáticas pelos ácidos húmicos.

Embora haja controvérsias quanto à atuação celular e molecular dos ácidos húmicos, atualmente, estudos apontam para uma estimulação da atividade e promoção da síntese das enzimas H^+ -ATPases da membrana plasmática, num efeito semelhante ao auxínico (Nardi *et al.*, 1991; Façanha *et al.*, 2002; Canellas *et al.*, 2002; Jindo *et al.*, 2012). Façanha *et al.* (2002) demonstraram que ácidos húmicos, isolados 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. As H^+ -ATPases são enzimas transmembranares capazes de hidrolizar ATP (Hager *et al.*, 1991; Frias *et al.*, 1996), gerando energia e um gradiente eletroquímico que está diretamente envolvido em dois mecanismos fundamentais para o desenvolvimento vegetal:

(i) energização do sistema secundário de translocação de íons, o que é fundamental para absorção de macro e micronutrientes (Sondergaard *et al.*, 2004), mecanismo que pode ser explicado pela ação das H^+ -ATPases na despolarização da membrana plasmática e, conseqüentemente, na ativação de transportadores;

(ii) promoção do aumento da plasticidade da parede celular por acidificação do apoplasto, fator fundamental para o processo de crescimento e alongamento da célula vegetal (Cosgrove, 1997). Esse último mecanismo está relacionado com a *teoria do crescimento ácido*, que postula que o aumento de extrusão de prótons, mediado pela H^+ -ATPase da membrana plasmática, induz a ação de enzimas específicas, que atuam sobre a parede celular, aumentando sua plasticidade e, conseqüentemente, permitindo o alongamento da célula (Rayle & Cleland, 1992).

Apesar de a estrutura dos ácidos húmicos ainda não estar completamente elucidada, sabe-se que essas substâncias são formadas por agregados moleculares heterogêneos, estabilizados por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas (Piccolo *et al.*, 2001). Albuizio & Ferrari (1989) postularam que o tamanho molecular dos ácidos húmicos pode ser modulado pela exsudação de ácidos orgânicos pelas raízes das plantas (ex.: ácidos cítrico, oxálico, succínico, fumárico), e observaram que essas frações menores de ácidos húmicos correlacionam-se, positivamente, com a liberação de Ca, Mg, Fe e Zn. Canellas *et al.* (2008b) verificaram que plântulas de milho, cultivadas em soluções contendo ácidos húmicos e ácido cítrico modificam o perfil de exsudação de ácidos pelas raízes e incrementam as características de crescimento radicular e a atividade das H^+ -ATPases. A quebra das ligações fracas dos agregados moleculares

de ácidos húmicos expõe moléculas com atividade semelhante às auxinas (Canellas *et al.*, 2011). De fato, vários trabalhos já relataram a presença de auxinas na estrutura supramolecular dos ácidos húmicos (Canellas *et al.*, 2002; Quaggiotti *et al.*, 2004; Trevisan *et al.*, 2010a,b; Muscolo *et al.*, 2013). Entretanto, os efeitos de estímulo ao crescimento e ao desenvolvimento radicular das plantas, em resposta à aplicação de ácidos húmicos, não são devidos apenas aos efeitos hormonais. Trevisan *et al.* (2011), por meio do monitoramento do perfil transcriptômico de *Arabidopsis thaliana*, tratada com substâncias húmicas, verificaram que outras rotas metabólicas independentes de auxina estão presentes, exercendo efeitos positivos no crescimento da planta. Segundo Mora *et al.* (2012), esses fatores poderiam atuar em conjunto com os fatores hormonais, ou de forma independente. Os autores verificaram que o aumento da concentração dos fitorreguladores auxina, etileno e óxido nítrico, em raízes de pepino tratadas com ácidos húmicos, não desempenham um papel essencial na expressão das principais mudanças de arquitetura radicular (Mora *et al.*, 2012).

Somados aos efeitos dos ácidos húmicos no enraizamento, ressaltam-se, também, os efeitos estimulantes na parte aérea, como incrementos do acúmulo de nutrientes foliares (Vaughan & Malcolm, 1979; Chen & Avid, 1990; Chen *et al.*, 2004; Eyheraguibel *et al.*, 2008; Baldotto *et al.*, 2009b; Mora *et al.*, 2010; Jannin *et al.*, 2012), da biossíntese de clorofilas (Tejada & Gonzalez, 2003; Ferrara & Brunetti, 2008; Baldotto *et al.*, 2009b; Ameri & Tehranifar 2012; Jannin *et al.*, 2012; Ahmad *et al.*, 2013), da biossíntese de carotenoides (Tejada & Gonzalez, 2003; Baldotto *et al.*, 2009b), da presença de cloroplastos (Jannin *et al.*, 2012) e do processo fotossintético (Ameri & Tehranifar 2012; Jannin *et al.*, 2012). Todos esses fatores resultam em incrementos da biomassa vegetal (Atiyeh *et al.*, 2002; Tejada & Gonzalez, 2003; Baldotto *et al.*, 2009b; Wangen *et al.*, 2013; Baldotto *et al.*, 2014), da produção de flores (Arancon *et al.*, 2006; Baldotto & Baldotto 2013; Baldotto & Baldotto, 2014a), de frutos (Arancon *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2011) e de sementes (Baldotto & Baldotto, 2014c).

Os mecanismos responsáveis pelo crescimento e desenvolvimento da parte aérea das plantas, em resposta à aplicação radicular e foliar de ácidos húmicos, ainda são pouco conhecidos. No trabalho de Mora *et al.* (2010), com plantas de pepino tratadas com ácidos húmicos nas raízes, foi verificado que esses incrementos são ocasionados pelo aumento da atividade de H⁺-ATPases radiculares, acompanhado em mudanças na distribuição de nitrato entre raiz e parte aérea. Os autores observaram que o aumento da concentração de nitrato

na parte aérea está relacionado com o aumento da concentração dos fitorreguladores citocininas e poliaminas (principalmente putrecina), levando aos incrementos no crescimento.

Por todos esses efeitos benéficos, relatados, dos ácidos húmicos, na produção vegetal, há um crescente interesse em seu uso nos sistemas agrícolas. No entanto, a aplicação não deve ser realizada de forma empírica, uma vez que a atividade biológica dos ácidos húmicos nas plantas é dependente da sua fonte (Adani *et al.*, 1998; Baldotto *et al.*, 2011c; Aguiar *et al.*, 2013; Baldotto *et al.*, 2014), da concentração aplicada (Malik & Azam 1985; Valdrighi *et al.*, 1996; Baldotto *et al.*, 2009b; Baldotto & Baldotto, 2013) e do genótipo da planta (Baldotto *et al.*, 2012, Bolonhezi *et al.*, 2013).

Dentre as fontes mais usadas para extração de ácidos húmicos encontram-se a leonardita (Adani *et al.*, 1998; Elena *et al.*, 2009; Mora *et al.*, 2010), o carvão (Adani *et al.*, 1998), a turfa (Silva *et al.*, 2011), o solo (Malik & Azam 1985; Baldotto *et al.*, 2011c), os resíduos de animais (Baldotto *et al.*, 2007) e os compostos orgânicos feitos de húmus de minhoca (vermicompostos) (Atiyeh *et al.*, 2002; Arancon *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2012; Baldotto & Baldotto 2013; Garcia *et al.*, 2014), de torta de filtro (Baldotto *et al.* 2009b), de esterco bovino (Arancon *et al.*, 2003; Baldotto & Baldotto, 2014a, b, c), de cama-de-frango (Baldotto & Baldotto, 2014a, b), de resíduos de alimentos (Arancon *et al.*, 2003), de lixo urbano (Canellas *et al.*, 2000; Jindo *et al.*, 2012) e de lodo de esgoto (Canellas *et al.*, 2000; Jindo *et al.*, 2012). A compostagem dos resíduos orgânicos favorece a extração de ácidos húmicos mais bioativos, quando comparados com os dos não compostados (Baldotto *et al.*, 2007) e com maior hidrofobicidade (Jindo *et al.*, 2012; Aguiar *et al.*, 2013), ou seja, não apenas a fonte, mas também o estágio de maturação do composto influencia na qualidade dos ácidos húmicos. De modo similar, Baldotto *et al.* (2011c) verificaram que ácidos húmicos mais estáveis, isolados de solos em estágio de intemperismo menos avançado, com argila de alta atividade e alta saturação por bases resultaram em maiores incrementos do crescimento radicular de *Arabidopsis thaliana*.

Independentemente da fonte de matéria orgânica utilizada, geralmente observa-se que concentrações mais baixas de ácidos húmicos apresentam atividade estimulante, na fisiologia vegetal, e que concentrações elevadas resultam em diminuição do crescimento e do desenvolvimento das plantas (Baldotto *et al.*, 2009b; Baldotto & Baldotto, 2013; Baldotto *et al.*, 2014; Baldotto & Baldotto, 2014a, b), o que torna necessário mais estudo para se definir a dose de ácidos húmicos que resulta na máxima eficiência para a característica

desejada, em determinada espécie vegetal. O sucesso da aplicação comercial dos ácidos húmicos em viveiro e, ou, em campo, para incrementar a produção vegetal, depende de estudos que definam a dose ótima para cada espécie, como apresentado na Tabela 3 para plantas ornamentais. Baldotto & Baldotto (2014b), por exemplo, verificaram que a aplicação de ácidos húmicos, em concentrações entre 15 e 20 mmol L⁻¹ de C, em sementes de girassol ornamental, cultivado em campo, proporciona a máxima eficiência na qualidade de hastes florais (maior comprimento e maiores diâmetro da haste floral e diâmetro da inflorescência), e a concentração de 37,8 mmol L⁻¹ de C resulta em maior produção (número de hastes florais).

O potencial de uso de ácidos húmicos na conservação e manejo dos ecossistemas naturais e agrários é vasto e promissor, incluindo, principalmente, a promoção do crescimento e desenvolvimento de plantas e o aumento da produção de flores, frutos e sementes (Arancon *et al.*, 2006; Baldotto & Baldotto, 2014a, b). Estudos recentes demonstram também o potencial de uso de ácidos húmicos no aumento da eficiência da adubação mineral (Pinto *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2013; Baldotto *et al.*, 2011c, Baldotto & Baldotto, 2014a, b) e na formulação de inoculantes e biofertilizantes (Marques Jr. *et al.*, 2008; Baldotto *et al.*, 2010b; Rodrigues *et al.*, 2014).

Baldotto *et al.* (2011a), por exemplo, demonstraram, de forma inovadora, o potencial de uso de ácidos húmicos (9,3 mmol L⁻¹ de C, na forma de ácidos húmicos de vermicomposto) combinados com ácido cítrico (0,005 mmol L⁻¹), no aumento da eficiência da adubação foliar de abacaxizeiro com fosfato de rocha (fosfato de Araxá), observando aumento dos conteúdos foliares de N, P, K, Ca e Mg e do crescimento da parte aérea das mudas. Também, em abacaxizeiro, com mudas propagadas *in vitro*, Baldotto *et al.* (2010b) verificaram que a aplicação de ácidos húmicos aumenta a eficiência da inoculação de bactérias promotoras de crescimento de plantas (gênero *Burkholderia*), acelerando o desenvolvimento das mudas inoculadas e, por consequência, diminuindo o tempo de aclimatização.

Outras pesquisas atuais apontam também o potencial de uso de ácidos húmicos na fitorremediação (Bandiera *et al.*, 2009); na aplicação de herbicidas (Foloni & Souza 2010); no controle de nematoides (Kesba & Beltagi 2012) e na diminuição dos efeitos nocivos nas plantas dos estresses oxidativo (Garcia *et al.*, 2012), salino (Battista *et al.*, 2012) e hídrico (Garcia *et al.*, 2014). Garcia *et al.* (2012; 2014) verificaram que os ácidos húmicos, dependendo da concentração, interferem na expressão de genes que codificam aquaporinas e controlam os níveis de espécies reativas de oxigênio e a ocorrência de

peroxidação lipídica, ou seja, estimulam os mecanismos de defesa das plantas às situações de estresse.

Notadamente, os ácidos húmicos apresentam um vasto potencial de aplicação na agricultura, necessitando-se de estudos que definam as concentrações a serem aplicadas (Baldotto *et al.*, 2014; Baldotto & Baldotto, 2014a, b, c) e os métodos de aplicação (Ameri & Tehranifar 2012; Baldotto & Baldotto, 2014c) e aprimorem a padronização e a definição das propriedades que deverão ser avaliadas para sua comercialização (Malcolm & MacCarthy, 1986; Baldotto *et al.*, 2007; Lodhi *et al.*, 2013).

A produção agropecuária apresenta-se em crescimento em todo o mundo, por causa do potencial de geração de renda e empregos, além dos benefícios ambientais e de melhoria da qualidade de vida, resultantes dos seus produtos. Dentre os fatores de produção agropecuária, atualmente torna-se fundamental a preocupação com a geração de tecnologia para fontes alternativas de nutrientes. O principal problema, que se focaliza na pesquisa pedológica, é a necessidade constante de aperfeiçoamento do manejo da fertilidade do solo em atividades agropecuárias, no país, principalmente, para atender à lei da restituição de nutrientes, minimizando o impacto nas fontes não renováveis de nutrientes. Para apresentar soluções a esses problemas, destaca-se a busca persistente da ciência, da tecnologia e da inovação brasileiras e a evolução dos sistemas de manejo integrados, que promovem uma agricultura tropical, no Brasil, já exemplar e em contínuo aperfeiçoamento (Baldotto *et al.*, 2010b).

Desde o início da colonização do Brasil até a agricultura atual, observou-se a transição entre sistemas itinerantes, o desenvolvimento de tecnologias para correção da acidez e uso de fertilizantes, a calibração de doses recomendáveis de nutrientes, em consonância com os materiais genéticos avançados, que surgiram e foram incluídos no manejo integrado, o qual considerou, também, o monitoramento e o manejo de fitossanidade, de plantas daninhas, da irrigação, da colheita e da comercialização (economia), etc. Embasadas por crescentes avanços da tecnologia, novas fronteiras agrícolas foram incorporadas e as produtividades vêm alcançando patamares recordes. A agropecuária brasileira tornou-se altamente competitiva, mesmo considerando-se as políticas de subsídio dos concorrentes internacionais. Nesse mesmo sentido, foi monitorada a qualidade dos sistemas agrícolas e, entre outros problemas, verificaram-se a erosão e a diminuição dos estoques de carbono orgânico dos solos, bem como seu corolário nas propriedades químicas, físicas e biológicas dos agroecossistemas. Contudo, em contrabalanço, como primeiro salto tecnológico, foi desenvolvido o Sistema Plantio Dire-

to, cujos benefícios já são detalhadamente comprovados. No mesmo sentido da agropecuária, o setor florestal aparece como gerador de alta tecnologia e alavanca a economia brasileira, pois a madeira é fundamental em nossa civilização e precisa ser cultivada. Em paralelo, o cenário atual demanda que os agroecossistemas busquem semelhanças com os ecossistemas originais na fronteira agrícola brasileira, ou seja, a floresta necessita ser reintroduzida nos sistemas de manejo. Nesse sentido, além de diversificar a renda e a alocação sazonal dos meios de produção, distribuindo melhor a força de trabalho, a integração lavoura, pecuária e floresta pode ser a evolução dos sistemas de manejo agropecuário para esse novo século (Baldotto *et al.*, 2010b), indo ao encontro dos mecanismos de desenvolvimento limpo, sobretudo de mitigação do efeito estufa (IPCC, 2013).

As principais limitações da maioria dos solos tropicais, sobretudo a classe dos Latossolos, são o insuficiente desenvolvimento de cargas elétricas negativas (baixa CTC), a elevada adsorção específica de fosfatos, a baixa disponibilidade de nutrientes e as altas concentrações de íons alumínio tóxicos. Essas adversidades podem ser minimizadas com a preservação e o incremento dos teores de carbono orgânico do solo, uma vez que a matéria orgânica apresenta grupos funcionais eletricamente carregados, que aumentam a CTC e diminuem a adsorção específica de P, disponibilizam nutrientes e têm a capacidade de complexar íons alumínio, reduzindo sua toxicidade. Assim sendo, os Latossolos, que se distribuem por, praticamente, todo o território nacional, como a classe de solos mais representativa do Brasil (Embrapa, 2013), ocupando cerca de 60% do território, são de grande potencial para agricultura, uma vez corrigidas essas limitações. Espera-se que preservar os estoques de carbono seja uma forma eficiente de iniciar a melhoria das propriedades químicas, físicas e biológicas dos Latossolos. Vários estudos têm indicado que a integração de lavoura com pecuária e florestas tem possibilitado a recuperação dos teores de matéria orgânica. Adicionalmente, é necessário o desenvolvimento de novos fertilizantes, menos dependentes de recursos naturais não renováveis, pois, mesmo com agroecossistemas mais semelhantes aos biomas originais, incluindo-se, no arranjo, as florestas, a exportação de nutrientes deverá ser contrabalançada pelo fornecimento de nutrientes por via de adubações, atendendo, assim, à lei da restituição (sustentabilidade).

A reciclagem de resíduos orgânicos pela compostagem e pelo preparo de biofertilizantes, bem como o isolamento de suas substâncias bioativas, agregando-lhes ainda maior valor econômico e podendo enriquecê-los com micro-organismos benéficos, torna-se um pilar para a busca por fontes alternativas de nutrientes. As substân-

cias provenientes desses processos poderiam ser usadas como veículos de inoculação de micro-organismos promotores de crescimento (sintetizadores de hormônios, fixadores de N, solubilizadores de P, etc). A identificação da reciclagem de resíduos orgânicos como fonte alternativa de nutrientes acontece no momento em que se estabelece a Política Nacional de Resíduos Sólidos e no momento clímax das atuais evidências da contribuição do CO₂ atmosférico para o aquecimento global (Eswaran *et al.*, 2001; Cerri *et al.*, 2003; Lal, 2001; Baldotto *et al.*, 2010b).

A maior parte do carbono orgânico fixado pelas plantas na fotossíntese retorna para atmosfera na forma de CO₂, pela decomposição dos resíduos vegetais no solo (Stevenson, 1994; Sposito, 2008). A compostagem é uma forma de preparo de fertilizantes orgânicos a partir de resíduos vegetais, ou animais, por meio da sua decomposição e estabilização na forma de húmus, num processo genericamente denominado humificação (Stevenson, 1994; Piccolo, 2001; Baldotto *et al.*, 2007). Na humificação, os resíduos macroscopicamente reconhecíveis são convertidos pelos micro-organismos aeróbicos, em um material escuro, estabilizado biológica, química e fisicamente, o composto orgânico. Esses processos acontecem naturalmente, no solo, contudo, com maior influência das variações dos fatores ambientais, que geralmente protelam a estabilização. A compostagem, por outro lado, visa a fornecer condições próximas às ótimas para a humificação dos resíduos orgânicos. Entre os fatores que mais influenciam a velocidade da compostagem estão, além da composição inicial dos resíduos orgânicos, a aeração (oxigênio para a oxidação), a temperatura e a umidade.

Durante a compostagem, há mineralização da matéria orgânica, aumentando a disponibilidade de nutrientes. Além disso, os compostos funcionam como bioestimulantes e condicionadores do solo, melhorando suas propriedades químicas, físicas e biológicas, como a capacidade de retenção de água e de nutrientes, a agregação das partículas, a porosidade, a atividade biológica, o antagonismo a pragas e patógenos (Baldotto *et al.*, 2007).

A decomposição dos resíduos orgânicos libera calor e, portanto, a aplicação de resíduos não humificados (“curtidos”) junto ao sistema radicular das plantas é inadequada, podendo resultar na sua morte. Assim, os resíduos orgânicos dificilmente podem ser usados como fertilizantes, antes da devida compostagem. Adicionalmente, os materiais orgânicos provenientes de diversas atividades industriais e agropecuárias necessitam ser reciclados, agregando valor econômico e prevenindo perturbações ambientais advindas de seu acúmulo inconveniente, sendo, portanto, matérias-primas de alto inte-

resse para o processo de compostagem e para o desenvolvimento de novas tecnologias em fertilizantes (Baldotto, 2006).

Embora se busquem as condições ótimas de compostagem, são necessárias, ainda, bases científicas, pois trata-se de processo ecológico complexo (Baldotto, 2006). De forma geral, a compostagem é realizada, combinando-se os resíduos orgânicos com inoculantes biológicos, em leiras que são reviradas e irrigadas para o controle da aeração, da umidade e da temperatura, num tempo que varia, com os materiais orgânicos e com as condições da compostagem, geralmente, de dias a meses.

A compostagem acontece em três fases. A primeira, denominada de fitotóxica, é caracterizada por reações ácidas, provenientes dos ácidos orgânicos, bem como dos esterco. Em condições adequadas, a fase fitotóxica dura de 10 a 20 dias. Decorridas as primeiras duas a três semanas, acontece a segunda fase, de semicura, na qual ocorre o processo de estabilização biológica. O fim deste estágio indica que o material não mais liberará calor e, também, não apresentará teores altos de acidez. A fase de estabilização biológica indica que os micro-organismos sintetizaram suas enzimas, efetuaram a decomposição dos resíduos orgânicos e finalizaram o ciclo de vida, sendo também decompostos, numa sucessão ecológica, até que o resíduo se estabilize. A terceira e última fase completa a humificação. A estabilização química indica que as substâncias presentes não estão mais reagindo entre si dentro do composto, apenas adquirindo tamanho, estrutura e conformação, ou seja, estabilidade física. Como visto, a humificação consiste na maturação biológica, química e física do composto orgânico, sendo o último estágio da compostagem (Baldotto, 2006).

Dentre os resíduos orgânicos com potencial econômico para a compostagem, destaca-se a cama de aviário, que consiste em excreta (urina e fezes), penas, descamações de pele, restos de alimento e soluções aquosas dos comedouros e bebedouros, misturados às camadas de palhas usadas para forrar os galpões de avicultura (Baldotto *et al.*, 2007). É um resíduo abundante, uma vez que a avicultura de corte produz, em média, 4 Mg de cama de aviário por ano, para cada 1.000 aves.

A cama de aviário era usada na alimentação de bovinos, até o ano de 2004, quando entrou em vigor a Instrução Normativa (IN) nº 8, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), que proibiu essa destinação. De forma complementar, a IN nº 41 do MAPA, de 2009, trata das punições cabíveis. Com a proibição, inclusive, de seu uso a lanço em pastagens, sem a devida carência, surge a necessidade econômica e ambiental de buscar um destino adequado para a cama de

aviário. A produção de fertilizantes orgânicos desponta como opção tecnológica mais promissora, uma vez que agrega também maior valor econômico. Contudo, a despeito de existirem trabalhos evidenciando a potencialidade agrônômica da cama de aviário, é necessária a obtenção de bases científicas, e não apenas empíricas, para o planejamento e uso adequado desse resíduo, na produção de fertilizantes orgânicos.

Os biofertilizantes são preparados a partir de resíduos orgânicos, tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas (Baldotto, 2006). A proporção entre água e resíduos orgânicos nos biofertilizantes será de 10 a 50%. Além dos resíduos orgânicos mais abundantes na região, como a cama de aviário e o fino de carvão, os biofertilizantes poderão ser enriquecidos com aditivos que os melhorem nutricionalmente (fosfatos de rocha, micronutrientes, etc), auxiliem a atividade microbiana (fontes de açúcares, carboidratos, etc) ou a enriqueçam pela adição de materiais de produções anteriores de biofertilizantes ou compostos orgânicos, terriços de serapilheira, liteira, etc. A estabilização será monitorada pela paralisação da atividade biológica e do desprendimento gasoso e pela análise do pH, da temperatura e dos teores de nutrientes, incluindo-se a relação C/N.

Conforme a revisão apresentada, os ácidos húmicos são substâncias bioativas que estimulam o desempenho das plantas. Todavia, as leis gerais da adubação, como a “lei do mínimo” e a “lei da restituição”, devem continuar sendo observadas. Ou seja, observa-se aumento de eficiência na produção vegetal com a aplicação de ácidos húmicos, mas é preciso que as condições de fertilidade do solo sejam adequadamente consideradas. Isso quer dizer que novas avaliações de disponibilidade de nutrientes no solo devem ser buscadas para o sistema de manejo, envolvendo aplicação de bioestimulantes vegetais, como os ácidos húmicos. A expectativa é que, tanto a afinidade na absorção de água, luz e nutrientes quanto a assimilação e o metabolismo sejam melhorados pela bioatividade dos ácidos húmicos, resultando em diferentes padrões de estado nutricional e necessitando de ajustes nos indicadores produtivos, para cada cultura e cada sistema de produção. Não se pode pensar numa agricultura extrativista, ideológica, sem referencial técnico; é necessário restituir os nutrientes exportados e perdidos quando se passa de um ecossistema para um agroecossistema. A opção de restituição pode ser diferente, comumente variando desde o uso apenas de fertilizantes minerais, até à restrição deles, com aplicação somente de fertilizantes orgânicos. Propõe-se que ambas as formas de agricultura são estratégicas para o Brasil e que é necessária a combinação de práticas de ambas as opções, para a formação de uma agricultura de transição neste novo século. Tem-se a expectativa de que, combinando-

se esses modos de produção também com florestas e criações, em sistemas agrossilvipastoris, possam ser aproveitadas muitas áreas atualmente subutilizadas em nosso país e dado mais um passo no agronegócio brasileiro. Os ácidos húmicos estarão também presentes, para o tratamento das sementes de essências florestais, pastagens e cultivos, e constituindo a matéria orgânica dos solos, aumentada pelos excrementos das criações nesse sistema. Vale ressaltar que as principais limitações dos Latossolos, a adsorção de fosfatos, as altas concentrações de Al^{3+} , a baixa saturação por bases poderiam ser melhoradas com o aumento da matéria orgânica do solo.

Possivelmente, os ácidos húmicos serão veículos de inoculação ou constituintes de inoculantes, contendo simbiontes fixadores de nitrogênio, solubilizadores de fontes rochosas de fosfatos e produtores de hormônios aceleradores do crescimento vegetal, o que solucionaria um dos grandes problemas de restituição de nutrientes em nossos Latossolos, principal classe de solo para todas as formas de agricultura praticadas.

A estabilidade química da matéria orgânica do solo ocorre com a formação de substâncias húmicas, por meio de um processo genérico denominado humificação. As substâncias húmicas vêm sendo concebidas como agregados supramoleculares, organizando-se em agrupamentos de diversos compostos orgânicos de baixa massa molecular, contendo domínios predominantemente hidrofílicos (ácidos fúlvicos), ou hidrofílico-hidrofóbicos (ácidos húmicos). Nos sistemas naturais, ocorre uma mistura desses domínios. Esses agregados são mantidos em solução por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas que, isoladamente, são ligações fracas, mas, quando somadas, podem fornecer estruturação a essas substâncias e, assim, resultar numa aparente alta massa molecular. Quando, operacionalmente, promove-se a ionização com extratores alcalinos, ambos os grupos são solubilizados e, ao contrário, a acidificação promove a precipitação apenas dos ácidos húmicos, que apresentam caráter menos polar e mais hidrofóbico que os ácidos fúlvicos, sendo, portanto, mais estáveis no ambiente.

No solo, por outro lado, as reações dos ácidos húmicos resultam nas conhecidas melhorias dos aspectos físicos, químicos e biológicos do sistema, como os aumentos da agregação, da porosidade, da capacidade de troca iônica, complexação de íons tóxicos e do substrato para desenvolvimento da fauna e flora do solo. Os pontos positivos do uso de resíduos orgânicos convergem para as necessidades específicas dos Latossolos. Todavia, apesar do apelo ambiental com relação ao sequestro de carbono no solo, os ácidos húmicos estão-se destacando mais por sua bioatividade, ou seja, como opção tecnológica, por seus efeitos benéficos quando aplica-

dos aos materiais propagativos, como sementes, estacas, mudas de raízes nuas, cultura de tecidos e, também, pulverizados na parte aérea de plantas cultivadas a campo ou em ambiente controlado, com resultados positivos já obtidos para os sistemas de produção, tanto o convencional quanto o orgânico.

Já foi bem firmado que os ácidos húmicos atuam no enraizamento de diversas plantas de interesse agrônomo. Os estudos sobre os ácidos húmicos apontam para sua atuação favorável ao desenvolvimento do sistema radicular, ao acúmulo de nutrientes, à biossíntese de clorofilas. Grande parte dos efeitos bioestimulantes dos ácidos húmicos tem sido creditada a sua atividade similar à dos hormônios vegetais da classe das auxinas, ou seja, podem promover o crescimento vegetal, em concentrações relativamente pequenas. Alguns mecanismos de ação têm sido propostos para explicar a indução do crescimento radicular pelos ácidos húmicos, como a formação de complexos solúveis com cátions, na rizosfera, e aumento da permeabilidade da membrana plasmática, pela ação surfactante desses bioestimulantes.

De acordo com a concepção mais moderna, a de arranjos supramoleculares, em contato com o ambiente acidificado da rizosfera, as partículas supraestruturais dos ácidos húmicos podem-se fragmentar e gerar subunidades potencialmente capazes de alterar o metabolismo celular, por meio da ativação de H^+ -ATPases da membrana plasmática de células de raiz. A atividade desses mecanismos leva à acidificação do apoplasto, região que está em contato com as células da raiz, e à ativação de exoenzimas degradadoras de parede celular, tornando-a mais susceptível à ação da pressão de turgescência vacuolar, ou seja, com isso, ocorre a expansão celular e, por consequência, a do tecido radicular. Esse mecanismo pode explicar a promoção do desenvolvimento radicular e o acúmulo de nutrientes das plantas submetidas à aplicação de ácidos húmicos. É possível que a ativação das H^+ -ATPases pelos ácidos húmicos promova a despolarização da membrana plasmática e, com isso, a ativação de transportadores secundários, responsáveis pelo incremento da absorção de macro e micronutrientes. Somam-se aos aspectos de crescimento e nutricionais, possíveis efeitos fisiológicos, manifestados pelo aumento dos pigmentos fotossintéticos após a aplicação dos ácidos húmicos.

O tratamento com ácidos húmicos promove o crescimento e o desenvolvimento das plantas de forma eficiente e duradoura. Observam-se resultados com plantas propagadas por estaquia e, também, *in vitro*, que foram tratadas uma única vez no enraizamento e que apresentaram resultados positivos até na ocasião de ida ao campo para plantio (Baldotto *et al.*, 2012). Os resultados mostram aumentos de produtividade e de qualidade

do produto. A composição nutricional dos alimentos produzidos com base em aplicação de ácidos húmicos é melhor. Destaca-se sua versatilidade para serem usados em diferentes etapas da produção, por poderem ser solubilizados e não apresentarem problemas de corrosão dos tubos de irrigação, e, ou pulverização e, principalmente, por não apresentarem incompatibilidade com o manejo já usado, seja o sistema de produção convencional ou o orgânico.

A aplicação é usualmente por via de solução, no tratamento de material propagativo ou em pulverização da parte aérea das plantas, em ambiente controlado ou a campo. Entende-se que a aplicação deve ser realizada nos estádios fisiológicos apropriados da cultura, por exemplo, antes do plantio, no material propagativo (sementes, estacas, bulbos, etc), seguida de pulverizações durante os estádios de crescimento vegetativo, florescimento e frutificação. Para material propagativo, usa-se a imersão das sementes, das bases das estacas ou do sistema radicular de mudas de raízes nuas. Os resultados têm mostrado que o efeito depende da concentração usada, ou seja, existe uma concentração ideal para cada cultura. Acima disso, há diminuição do efeito, inclusive, algumas vezes, sendo prejudiciais em relação à não aplicação. Assim, mesmo dentro desse curto intervalo, são observados efeitos benéficos, para algumas plantas, e diminuição de desempenho, para outras. Além disso, os ácidos húmicos variam em composição, em função do material usado para seu isolamento. Isso quer dizer que não é recomendável o uso dos ácidos húmicos de forma empírica, sem conhecimento científico. Como é uma tecnologia em construção, devem os pesquisadores interligar-se em redes de conhecimento, para irem contribuindo com opções que melhorem o efeito dos ácidos húmicos na produtividade da agricultura brasileira.

Como já dito, uma grande vantagem da aplicação dos ácidos húmicos é a compatibilidade com os demais sistemas de produção agrícolas. Sua aplicação dentro das concentrações adequadas é benéfica, mas ressalta-se, contudo, que se deve conhecer a concentração ideal para cada cultura.

Pode-se considerar que o custo dos ácidos húmicos é baixo, uma vez que eles são extraídos de compostos orgânicos e aplicam-se concentrações baixas, de miligramas por litro. Os procedimentos de extração são simples, podendo ser adaptados para uma empresa rural, sem maiores impactos de resíduos do processo de obtenção. Como são aplicadas concentrações baixas, o processo de extração, mesmo se operacionalizado por empresas comerciais, chegará ao produtor com preços acessíveis, que não onerarão demasiadamente o custo de produção. O custo benefício é alto e, para a análise econômica, usa-se, praticamente o custo de aplicação.

Como a eficiência da absorção de nutrientes aumenta, é maior a eficiência do uso de fertilizantes. Esse fato é muito importante, pois mesmo na agricultura de alta produtividade, é imperativo buscar novos fertilizantes, dado o alto custo e à finitude das matérias-primas vindas de recursos naturais não renováveis. O Brasil precisa dedicar-se fortemente a atender todos os sistemas de produção, pois é estrategicamente adequado incentivar, tanto a agricultura de grandes áreas e produtividade quanto a agricultura orgânica, comumente familiar e, também, os demais arranjos produtivos. O uso dos ácidos húmicos adequa-se a todas essas modalidades, sem incompatibilidade com seus sistemas de produção, como já mencionado.

É necessário, ainda, caminhar persistentemente para a determinação das concentrações ótimas de ácidos húmicos para as diferentes culturas, para cada sistema de manejo e para cada região. Adicionalmente, uma forte possibilidade é o uso de ácidos húmicos para favorecer a inoculação de micro-organismos promotores de crescimento, por exemplo, os fixadores de nitrogênio, os solubilizadores de fósforo e os produtores de auxinas.

Com o crescente aumento dos custos e dos impactos ambientais, gerados pela fabricação e uso de fertilizantes químicos, a busca de métodos sustentáveis tem incentivado os estudos com bactérias promotoras de crescimento vegetal (Baldotto *et al.*, 2010b).

As bactérias promotoras de crescimento podem colonizar a região rizosférica e filosférica, o interior (endofíticas) ou a superfície (epifíticas) de tecidos vegetais como potenciais agentes do crescimento e de proteção de plantas. Essas bactérias são descritas como capazes de fixar nitrogênio atmosférico, produzir hormônios vegetais, solubilizar fosfato, sintetizar sideróforos, promover o controle biológico e a indução de resistência sistêmica na planta hospedeira. Deste modo, o isolamento, a caracterização e a seleção de bactérias promotoras de crescimento, visam, portanto, à possibilidade de agregar valor em propágulos, ou em tratamentos de aclimatação e, em campo, ao inocular as plantas com estirpes selecionadas.

Os ácidos húmicos poderiam ser fonte de carbono para esses micro-organismos, auxiliando, ainda, na aderência às plantas e na proteção contra as condições desfavoráveis, como a radiação solar, prolongando a vida útil do inóculo e, com isso, melhorando a eficiência de colonização das plantas por esses organismos benéficos, os quais são selecionados no meio ambiente, cultivados em laboratório e reaplicados, para viverem associados às plantas e aumentarem seu desempenho produtivo. Especialmente, essa é uma biotecnologia de grande potencial para a propagação de plantas, sobretudo para a cultura de tecidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do progresso acelerado no estudo da química das substâncias húmicas, há muitas indefinições e pouco consenso sobre o assunto. As substâncias húmicas têm sido descritas genericamente como macromoléculas orgânicas heterogêneas, de coloração escura, resultado do metabolismo de micro-organismos. A aplicação do conceito da química das supramoléculas às substâncias húmicas, em razão de uma série de evidências cromatográficas e espectroscópicas, levou à postulação de uma nova concepção para a sua estrutura. Pelo modelo supramolecular, substâncias orgânicas diversas, mas relativamente pequenas, formam agregados unidos entre si por ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas fracas, formando um arranjo supramolecular. Esse arranjo apresenta massa molecular só aparentemente elevada, mas que pode ser constante e indefinidamente alterada, de acordo com as variações das condições do meio de reação. Os ácidos fúlvicos foram definidos como produto da associação de moléculas pequenas e hidrofílicas, com uma quantidade de grupos funcionais ácidos suficiente para manter os agregados dispersos, em qualquer valor de pH. Os ácidos húmicos, por sua vez, foram definidos como associações nas quais predominam compostos hidrofóbicos (cadeias polimetilênicas, ácidos graxos, esteroides), estabilizados em pH neutro por forças hidrofóbicas dispersivas. A conformação dos ácidos húmicos cresce progressivamente de tamanho quando as forças oriundas das ligações com o hidrogênio são progressivamente aumentadas, até um valor baixo de pH, no qual floculam. O termo humina refere-se à fração orgânica insolúvel, remanescente da extração dos ácidos húmicos e fúlvicos.

Assim, a concepção estrutural mais aceita atualmente indica que as substâncias húmicas apresentam-se como agregados supramoleculares, organizando-se em assembleias de diversos compostos orgânicos de baixa massa molecular, contendo domínios predominantemente hidrofílicos (ácidos fúlvicos) ou hidrofílico-hidrofóbicos (ácidos húmicos). O que ocorre nos sistemas naturais é uma mistura desses domínios, ou seja, as substâncias húmicas não ocorrem de forma discreta, mas contínua. Esses agregados são mantidos em solução por pontes de hidrogênio e por interações hidrofóbicas que, isoladamente, são ligações fracas, que, entretanto, quando somadas, podem fornecer estruturação a essas substâncias e, assim, resultar numa apenas aparente alta massa molecular. Quando, operacionalmente, promove-se a ionização com extratores alcalinos, ambos os grupos são solubilizados. A acidificação, pelo contrário, promove apenas a precipitação dos chamados ácidos húmicos, que apresentam caráter menos polar que

o dos ácidos fúlvicos, não afetados pelo abaixamento do pH. A composição elementar, os grupos funcionais e a reatividade das substâncias húmicas podem ser interpretados de forma relativamente convergente, à luz de ambos os modelos.

As titulações redox de substâncias húmicas permitem estimar o potencial formal padrão do eletrodo (E_H^0) e a capacidade de oxidação (COx), fatores intensidade e capacidade da atividade de elétrons, respectivamente, análogos ao pH e à capacidade de neutralização, para o caso de prótons. Os radicais livres do tipo semiquinonas das substâncias húmicas são grupos doadores de elétrons e podem ser oxidados pelo iodo (I_2), nas titulações redox iodimétricas. O processo de estabilização dos resíduos orgânicos ocorre com o aumento da concentração de espécies aromáticas, como os grupos fenólicos, as quinonas e as semiquinonas. Esses grupamentos químicos apresentam aspectos semelhantes, dos pontos de vista estrutural e reativo, sendo importantes nas reações redox das substâncias húmicas. Observa-se, portanto, a elevação conjunta da atividade redox e da concentração de grupos funcionais aromáticos, associados à estabilidade das substâncias húmicas, cuja gênese é modulada pelas ambiências das amostras. Portanto, os dados mostraram a possibilidade de comparação e de monitoramento dos estoques de matéria orgânica de solos, adubos orgânicos e sedimentos de águas interiores e oceânicas, por meio dos índices de estabilidade do carbono, a partir das titulações redox, aqui abordadas. Adicionalmente, nas regiões tropicais, os solos encontram-se, frequentemente, em estágio avançado de intemperismo, com argilas de baixa atividade, com elevados teores de óxidos de Fe e de Al, alta capacidade de adsorção de fosfatos e, algumas vezes, caráter eletropositivo. Assim, a avaliação qualitativa dos estoques de matéria orgânica, por meio da COx das substâncias húmicas, pode contribuir para a adoção de estratégias de manejo, visando ao aumento das suas formas reduzidas e à geração de cargas negativas nesses sistemas. Ao contrário, espera-se que a oxidação dos resíduos orgânicos resulte na maior emissão de gases de efeito estufa e na diminuição da fertilidade do solo.

Quanto ao fenômeno de adsorção de P, a eletroquímica é de fundamental importância na ciclagem desse elemento em sistemas naturais, sobretudo nos solos tropicais, comumente ricos em óxidos de Fe. As substâncias húmicas podem atuar como transportadores de elétrons entre micro-organismos e a fase sólida férrica. Na presença de substâncias húmicas como mediadoras das reações redox, o sistema integrado poderia superar as limitações impostas pela baixa solubilidade das formas cristalinas de Fe, aumentando a cinética de redução, podendo resultar na solubilização do P previamente adsorvido.

Mesmo nos solos aerados, acontecem microcosmos redox representativos, na porosidade de menor diâmetro, permanentemente saturada com água. Contudo, a taxa de redução microbiana de substâncias húmicas e de espécies sólidas de Fe(III) depende da presença dos microorganismos apropriados, da qualidade e da concentração de substrato. Esses fatores condicionam o potencial redox, que pode controlar a dinâmica e o campo de estabilidade das espécies químicas existentes. Assim, a redução microbiana de substâncias húmicas não só tem consequências para a biogeoquímica de Fe e P, mas, também, no destino de poluentes inorgânicos e orgânicos no ambiente. Esses resultados sugerem que redução microbiana de substâncias húmicas tenha papel indispensável na mobilização e retenção de metais tóxicos e hidrocarbonetos e na degradação de poluentes orgânicos, tornando-se um importante tema a ser considerado na continuidade da pesquisa científica.

Dados recentes, estimados por cálculos de energia livre de reação, mostraram que espécies de quinonas oxidadas e reduzidas formam assembleias estáveis. Essas evidências, também com base em propriedades termodinâmicas, a partir de métodos espectroscópicos, corroboram os dados de eletroquímica aqui apresentados e convergem para a teoria dos arranjos supramoleculares das substâncias húmicas, permitindo inferir que a atração entre quinonas doadoras e receptoras de elétrons possa ser computada entre as forças que mantêm essas associações. Esse é um campo situado na fronteira do conhecimento químico-estrutural das substâncias húmicas e, conseqüentemente, fundamental para o entendimento e o monitoramento do balanço de C nos sistemas naturais antropicamente perturbados.

As substâncias húmicas, concebidas como supramoléculas, apresentam a propriedade de proveniência de biopolímeros, fragmentos que formam uma parte integral ou lábil da arquitetura molecular e, assim, governam sua conformação e sua reatividade química. Esses biopolímeros podem ser bioativos, ou seja, bioestimulantes e, assim, possibilitarem oportunidades tecnológicas para a agricultura tropical.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pela oportunidade de publicar esta revisão na Revista Ceres, em tão importante data comemorativa. As instituições UFES, UNIVERSO, UENF e UFV foram fundamentais nesses 20 anos, aproximadamente, de acúmulo de conhecimentos sobre Química do Solo, especialmente os nossos orientadores e colegas, ajudando-nos nessa tentativa de compreender os trabalhos e apresentar uma sequência ou ordem nessa revisão. Nessa busca, integramo-nos e contamos com a

colaboração de professores e instituições, entre eles, José Augusto Teixeira do Amaral (Fitotecnia/UFES), Ary Carlos Xavier Velloso (Solos/UFRRJ e UENF), Carlos Eduardo Rezende (Ciências Ambientais/UENF), Doracy Pessoa Ramos (Solos UFRRJ e UENF), Fábio Lopes Olivares (Biociências e Biotecnologia/UENF), Luciano Pasqualoto Canellas (Solos/UENF), Maria Cristina Canella (Ciências Químicas/UENF) e Ricardo Bressan Smith (Fisiologia Vegetal/UENF), Gabriel Araújo Santos (Solos/UFRRJ), Ladislau Martin-Neto (CNPq/EMBRAPA), Maurício Paulo Ferreira Fontes e Víctor Hugo Alvarez V. (Solos/UFV), Alessandro Piccolo e Riccardo Spaccini (*Università di Napoli Federico II, Portici, Italia*), Nelson Garcés Pérez (*Facultad de Agronomía de la UNAH, Cuba*). Ressaltamos, também, a valorosa contribuição dos funcionários e dos alunos de graduação e pós-graduação, vinculados ao estudo de Química e Fertilidade do Solo. Agradecemos à Engenheira-Arquiteta, Urbanista e Sanitarista Maeli Estrela Borges, pelas sugestões à revisão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adani F, Genevini P, Zaccheo P & Zocchi G (1998) The effect of commercial humic acid on tomato plant growth and mineral nutrition. *Journal of Plant Nutrition*, 21:561-575.
- Aguiar NO, Olivares FL, Novotny EH, Dobbss LB, Balmori DM, Santos-Júnior LG, Chagas JG, Façanha AR & Canellas LP (2013) Bioactivity of humic acids isolated from vermicomposts at different maturation stages. *Plant and Soil*, 362:161-174.
- Ahmad I, Saquib RU, Qasim M, Saleem M, Khan AS & Yaseen M (2013) Humic acid and cultivar effects on growth, yield, vase life, and corm characteristics of gladiolus. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73:339-344.
- Alberts JJ, Schindler, JE & E Miller RW (1974) Elemental mercury evolution mediated by humic acid. *Science*, 184:895-896.
- Albuzio A & Ferrari G (1989) Modulation of the molecular size of humic substances by organic acids of the root exudates. *Plant and Soil*, 113:237-241.
- Almeida MG, Rezende CE & Souza CMM (2007) Variação temporal, transporte e partição de Hg e carbono orgânico nas frações particulada e dissolvida da coluna d'água da bacia inferior do Rio Paraíba do Sul, RJ, Brasil. *Geochimica Brasiliensis*, 21:111-129.
- Ameri A & Tehranifar A (2012) Effect of humic acid on nutrient uptake and physiological characteristic *Fragaria ananassa* var: camarosa. *Journal of Biological Environmental Science*, 6:77-79.
- Arancon NQ, Edwards CA, Lee S & Byrne R (2006) Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 42:65-69.
- Arancon NQ, Lee S, Edwards CA & Atiyeh R (2003) Effects of humic acids derived from cattle, food and paper-waste vermicomposts on growth of greenhouse plants *Pedobiologia*, 47:741-744.
- Atiyeh RM, Lee S, Edwards CA, Arancon NQ, Metzger JD (2002) The influence of humic acids derived from earthworm-processed organic wastes on plant growth. *Bioresource Technology*, 84:07-14.
- Baldotto LEB & Baldotto MA (2014a) Growth and production of ornamental sunflower grown in the field in response to application of humic acids. *Ciência Rural* (no prelo).

- Baldotto LEB & Baldotto MA (2014b) Adventitious rooting on the Brazilian red-cloak and sanchezia after application of indole-butyric and humic acids. *Horticultura Brasileira*, 32:426-431.
- Baldotto LEB, Baldotto MA, Canellas LP, Smith REB & Olivares FL (2010b) Growth promotion of pineapple 'Vitória' by humic acids and Burkholderia spp. during acclimatization. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34:1593-1600.
- Baldotto LEB, Baldotto MA, Giro VB, Canellas LP, Olivares FL & Bressan-Smith R (2009b) Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante aclimação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33:979-990.
- Baldotto LEB, Baldotto MA, Gontijo JB, Oliveira FM de & Gonçalves J (2014) Aclimatização de orquídea (*Cymbidium* sp.) em resposta à aplicação de ácidos húmicos. *Ciência Rural*, 44:830-833.
- Baldotto LEB, Baldotto MA, Soares RR, Martinez HEP & Venegas VHA (2012) Adventitious rooting in cuttings of croton and hibiscus in response to indolbutyric acid and humic acid. *Revista Ceres*, 59:476-483.
- Baldotto LEB, Baldotto MA, Viana AP, Olivares FL & Bressan-Smith R (2010c) Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merrill) cultivar vitória durante a aclimação. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34:349-360.
- Baldotto MA (2006) Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos. Tese de Doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense "Darcy Ribeiro", Campos dos Goytacazes. 100p.
- Baldotto MA & Baldotto LEB (2013) Gladiolus development in response to bulb treatment with different concentrations of humic acids. *Revista Ceres*, 60:138-142.
- Baldotto MA & Baldotto LEB (2014c) Produtividade de milho em condições de campo em resposta à aplicação de ácidos húmicos na ausência e na presença de calagem e adubação mineral. Disponível em: < <http://www.eventosolos.org.br/fertbio2014/>>. Acessado em: 02 de Outubro de 2014.
- Baldotto MA, Canela MC, Canellas LP, Dobbss LB & Velloso ACX (2010a) Redox index of soil carbon stability. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 34:1543-1551.
- Baldotto MA, Canellas LP, Canela MC & Velloso ACX (2005) Propriedades redox de ácidos húmicos. In: Canellas LP & Santos GA (Eds.) *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, UENF. 348p.
- Baldotto MA, Canellas LP, Canela MC, Rezende CE & Velloso ACX (2008b) Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de solo cultivado com cana-de-açúcar por longo tempo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 3:1043-1052.
- Baldotto MA, Canellas LP, Canela MC, Rezende CE & Velloso ACX (2009a) Propriedades redox da matéria orgânica isolada de sedimentos ultrafiltrados do Rio Paraíba do Sul. *Química Nova*, 32:891-896.
- Baldotto MA, Canellas LP, Canela MC, Simões ML, Martin-Neto L, Fontes MPF & Velloso ACX (2007) Propriedades redox e grupos funcionais de ácidos húmicos isolados de adubos orgânicos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 3:465-475.
- Baldotto MA, Canellas LP, Mendonca ES, Dobbss L, Velloso ACX & Amaral Sobrinho NMB (2008a) Reações da matéria orgânica In: *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. 2ªed. Porto Alegre, Metrópole. p.45-63.
- Baldotto MA, Giro VB, Baldotto LEB, Canellas LP & Velloso ACX (2011a) Initial performance of pineapple and utilization of rock phosphate applied in combination with organic compounds to leaf axils. *Revista Ceres*, 58:393-401.
- Baldotto MA, Gobo AAR, Salomão MSMB, Rezende CE & Camargo PB (2013) Frações da matéria orgânica e propriedades redox de substâncias húmicas em sedimentos de oceanos profundos. *Química Nova*, 36:1288-1295.
- Baldotto MA, Muniz RC, Baldotto LEB & Dobbss LB (2011c) Root growth of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. treated with humic acids isolated from typical soils of Rio de Janeiro state, Brazil. *Revista Ceres*, 58:504-511.
- Baldotto MA, Rosa RCC, Canellas LP, Rangel TP, Salomão MSMB & Rezende CE (2011b) 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.
- Bandiera M, Mosca G & Vamerali T (2009) Humic acids affect root characteristics of fodder radish (*Raphanus sativus* L. var. oleiformis Pers.) in metal-polluted wastes. *Desalination*, 246:78-91.
- Bartlett RJ & James BR (1993) Redox chemistry of soils. *Advances in Agronomy*, 50:151-208.
- Bass Becking LGN, Kaplan IR & Moore D (1960) Limits of the natural environment in terms of pH and oxidation-reduction potentials. *Journal of Geology*, 68:243-284.
- Batista LRL, Gonzaga GBM, Farias JJA, Reis LS, Silva JS & Silva RF (2012) Efeito do ácido húmico no desenvolvimento da cultura da alface (*Lactuca sativa*) irrigada com diferentes níveis de salinidade. In: VII CONNEPI – Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação, Palmas. Anais, IFTO. p.1-7.
- Bolonhezi AC, Godoy IL, Teixeira EB, Schmitz GAF & Ribeiro NA (2013) Ácidos húmicos e fúlvicos aplicados sobre soqueira de variedades de cana-de-açúcar com posterior incorporação em ambientes supressivos. In: 7ª Workshop Agroenergia, Ribeirão Preto. Anais, Infobios. p.1-4.
- Budziak CR, Maia CMBF & Mangrich AS (2004) Transformações químicas da matéria orgânica durante a compostagem de resíduos da indústria madeireira. *Química Nova*, 27:399-403.
- Busato JG, Canellas LP, Dobbss LB, Baldotto MA, Aguiar NO, Marciano CR & Olivares FL (2009) Guia para Adubação Orgânica. Niterói, Secretaria de Agricultura do Estado do Rio de Janeiro / Pesagro. 29p. (Manual Técnico, 14).
- Camargo FAO, Santos GA & Guerra GM (1999) Macromoléculas e substância húmicas. In: Santos GA & Camargo FAO (Eds.) *Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais*. Porto Alegre, Gêneses. p.27-40.
- Canellas LP & Santos G de A (2005) *Humosfera: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas*. Campos dos Goytacazes, UENF. 348p.
- Canellas LP, Dantas DJ, Aguiar NO, Peres LEP, Zsogon A, Olivares, FL, Dobbss LB, Façanha AR, Nebbioso A & Piccolo A (2011) Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology*, 159:202-211.
- Canellas LP, Olivares FL, Okorokova-Facanha AL & Facanha AR (2002) 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.
- Canellas LP, Santos GA, Moraes AA, Rumjanek VM & Olivares FL (2000) Avaliação de características de ácidos húmicos de resíduos de origem urbana: I. Métodos espectroscópicos (UV-Vis, IV, RMN 13C-CP/MAS) e microscopia eletrônica de varredura. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 24:741-750.
- Canellas LP, Teixeira Junior LRL, Dobbss LB, Silva CA, Medici LO, Zandonadi DB & Façanha AR (2008b) Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Annals of Applied Biology*, 153:157-166.
- Canellas LP, Zandonadi DB, Busato JG, Baldotto MA, Simoes ML, Martin-Neto L, Façanha AR, Spaccini R & Piccolo A (2008a) Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Science*, 173:624-637.

- Carvalho JVS, Mendonça ES, Junior NLS, Reis C, Reis EL & Shaefer CEGR (2013) Caracterização potenciométrica de substâncias húmicas extraídas de solos da Antártica marítima. *Química Nova*, 36:1338-1342.
- Cerri CEP, Coleman K, Jenkinson DS, Bernoux M, Victoria R & Cerri CC (2003) Modeling soil carbon from forest and pasture ecosystems of Amazon, Brazil. *Soil Science Society of America Journal*, 67:1879-1887.
- Chen Y & Avaid T (1990) Effects of humic substances on plant growth. In: Maccarthy P, Capp CE, Malcolm RL & Bloom PR (Eds.) *Humic substances in soil and crop sciences: selected readings*. Madison, American Society of America. p.161-186.
- Chen Y, Clapp CE & Magen H (2004) Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: The role of organo-iron complexes. *Plant Nutrition and Soil Scienc*: 1089-1095.
- Chen Y, Senesi N & Schnitzer M (1977) Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Science Societ of American Journal*, 41:352-358.
- Clapp CE & Hayes MHB (1999) Sizes and shapes of humic substances. *Soil Science*, 164: 77-789.
- Conte P, Spaccini R, Smejkalová D, Nebbioso A & Piccolo A (2007) Spectroscopic and conformational properties of size-fractions separated from a lignite humic acids. *Chemosphere*, 69:1032-1039.
- Cosgrove DJ (1997) Relaxation in a high-stress environment: The molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell*, 9:1031-1041.
- Cunha TJF (2005) Ácidos húmicos de solos escuros da Amazônia. Tese de Doutorado. UFRRJ, Seropédica. 140p.
- Dobbss LB, Baldotto MA, Canellas LP & Rumjanek VM (2009) Caracterização química e espectroscópica de ácidos húmicos e fúlvicos isolados da camada superficial de Latossolos brasileiros. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 33:51-63.
- Elena A, Diane L, Eva B, Marta F, Roberto B, Zamarreño AM & García-Mina JG (2009) The root application of a purified leonardite humic acid modifies the transcriptional regulation of the main physiological root responses to Fe deficiency in Fe-sufficient cucumber plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47:215-223.
- Embrapa (1980) Centro Nacional de Levantamento e Classificação de Solos. I Reunião de Classificação e Correlação de Solos - BT n° 62. Rio De Janeiro, Embrapa Produção de Informação. 79p.
- Embrapa (2013) Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3ªed. Rio de Janeiro, Centro Nacional de Pesquisa em Solos. 353p.
- Eswaran H, Lal R & Reich P (2001) Land degradation: an overview. In: Bridges E, Hannam I, Oldeman L, Pening de Vries F, Scherr S & Som-patpanit S (Eds.) *Responses to Land Degradation*. In: 2nd International Conference on Land Degradation and Desertification, Khon Kaen. Proceedings, Science Publishers. p. 20-35.
- Eyheraguibel B, Silvestre J & Morard P (2008) Effects of humic substances derived from organic waste enhancement on the growth and mineral nutrition of maize. *Bioresource Technology*, 99:4206-4212.
- Façanha AR, Façanha ALO, Olivares FL, Guridi F, Santos GA, Velloso ACX, Rumjanek VM, Brasil F, Schripsema J, Braz-Filho R, Oliveira MA & Canellas LP (2002) Bioatividade de ácidos húmicos: efeitos sobre o desenvolvimento radicular e sobre a bomba de prótons da membrana plasmática. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37:1301-1310.
- Fernández RIE, Novais RF, Nunes FN & Ker JC (2008a) Reversibilidade do fósforo não-lábil em solos submetidos à redução microbiana e química. I - Alterações químicas e mineralógicas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:2307-2317.
- Fernández RIE, Novais RF, Nunes FN & Ker JC (2008b) Reversibilidade de fósforo não-lábil em solos submetidos à redução microbiana e química. II - Extrações sucessivas do fósforo pela resina de troca aniônica. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32: 2319-2330.
- Ferrara G & Brunetti G (2008) Influence of foliar applications of humic acids on yield and fruit quality of table grape cv. Itália. *Journal International Sciences de la Vigne et du Vin*, 42:79-87.
- Foloni LL & Souza ELC (2010) Avaliação do uso de ácido húmico na redução do uso de herbicidas pré-emergentes na cana planta. In: 27º Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, Ribeirão Preto. Anais, Sociedade Brasileira de Plantas Daninhas. p.2056-2060.
- Frias I, Caldeira MT, Perez CJR, Navarro AJP, Culianez MFA, Kuppinger O, Stransky H, Pages M, Hager A & Serrano R (1996) A major isoform of the maize plasma membrane H^+ -ATPase: characterization and induction the maize plasma membrane H^+ -ATPase: characterization and induction auxin in coleoptiles. *Plant Cell*, 8:1533-1544.
- Garcia AC, Santos LA, Izquierdo FG, Rumjanek VM, Castro RN, Santos FS, Souza LGA & Berbara RLL (2014) Potentialities of vermicompost humic acids to alleviate water stress in rice plants (*Oryza sativa* L.) *Journal of Geochemical Exploration*, 136:48-54.
- Garcia AC, Santos LA, Izquierdob FG, Sperandio MVL, Castro RN & Berbara RLL (2012) Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. *Ecological Engineering*, 47:203-208.
- Govindasmy R & Chandrasekaran S (1992) Effect of humic acids on the growth, yield and nutrient content of sugarcane. *The Science of the Total Environment*, 117/118:575-581.
- Hager A, Debus G, Edel HG, Stransky H & Serrano R (1991) Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high-turnover pool of plasma-membrane H^+ -ATPase. *Planta*, 185:527-537.
- Helburn RS & MacCarthy P (1994) Determination of some redox properties of humic acids by alkaline ferricyanide titration. *Analytica Chimica Acta*, 295:263-272.
- IHSS - International Humic Substances Society (2014) Products. Disponível em: <<http://www.ihss.gatech.edu/products.html>>. Acessado em: 15 de julho de 2014.
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change (2013) Contribution of working group I to the fifth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. In: Stocker TF, Qin D, Plattner GK, Tignor MMB, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V & Midgley PM (Eds.) *Climate change 2013: the physical science basis*. New York, IPCC. p.01-27.
- Jannin L, Arkoun M, Ourry A, Laíné P, Goux D, Garnica M, Fuentes M, Francisco SS, Baigorri R, Cruz F, Houdusse F, Garcia-Mina JM, Yvin JC & Etienne P (2012) Microarray analysis of humic acid effects on *Brassica napus* growth: Involvement of N, C and S metabolisms. *Plant Soil*, 359:297-319.
- Jindo K, Martim AS, Navarro EC, Pérez-Alfocea F, Hernandez T, Garcia C, Aguiar NO & Canellas LP (2012) Root growth promotion by humic acids from composted and non-composted urban organic wastes. *Plant Soil*, 353:209-220.
- Kesba HH & El-Beltagi HS (2012) Biochemical changes in grape rootstocks resulted from humic acid treatments in relation to nematode infection. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 287-293.
- Kononova MM (1982) *Matéria orgânica del suelo: su naturaleza, propiedades y métodos de investigación*. Barcelona, Oikos-Tou. 365p.
- Lal R (2001) World cropland soils as a source or sink for atmospheric carbon. *Advances in Agronomy*, 71:146-191.
- Leal JR & Veloso ACS (1973) Adsorção de fosfato em Latossolo sob vegetação de cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 8:81-88.
- Lima AA, Alvarenga MAR, Rodrigues L & Carvalho JG (2011) Concentração foliar de nutrientes e produtividade de tomateiro cultivado sob diferentes substratos e doses de ácidos húmicos. *Horticultura Brasileira*, 29:63-69.

- Lindsay WL (1979) Chemical equilibria in soils. New York, John Wiley & Sons. 449p.
- Lodhi A, Tahir S, Iqbal Z, Mahmood A, Akhtar M, Qureshi TM, Yaquub M & Naem A (2013) Characterization of commercial humic acid samples and their impact on growth of fungi and plants. *Soil Environment*, 32:63-70.
- Lovley DR, Coates JD, Blunt-Harris EL, Phillips EJP & Woodward JC (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382:445-448.
- Lovley DR, Woodward JC, Blunt-Harris EL, Hayes L, Phillips EJP & Coates JD (1998) Humic substances as mediator for microbially-catalyzed metal reduction. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 26:152-157.
- Malcolm RL & MacCarthy P (1986) Limitations in the use of commercial humic acids in water and soil. *Environment Science Technology*, 20:904-911.
- Malik K & Azam F (1985) Effect of humic acid on wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling growth. *Environmental and Experimental Botany*, 25:245-252.
- Marques Jr RB, Canellas LP, Silva LG & Olivares FL (2008) Promoção de enraizamento de microtoletes de cana-de-açúcar pelo uso conjunto de substâncias húmicas e bactérias diazotróficas endofíticas. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 32:1121-1128.
- Martin-Neto L, Andriulo AE & Traghetta D (1994a) Effects of cultivation on ESR spectra of organic matter from soil size fractions of a Mollisol. *Soil Science*, 157:365-372.
- Martin-Neto L, Rosell R & Sposito G (1998) Correlation of spectroscopic indicators of humification with mean annual rainfall along a temperate grassland climosequence. *Geoderma*, 81:305-311.
- Martin-Neto L, Vieira EM & Sposito G (1994b) Mechanism of atrazine sorption by humic acid: a spectroscopic study. *Environmental Science & Technology*, 28:1867-1873.
- Matthiessen A (1995) Determining the redox capacity of humic substances as a function of pH. *Vom Wasser*, 84:229-235.
- Milori DMBP, Martin-Neto L, Bayer C, Mielniczuck J & Bagnato VS (2002) Humification degree of soil humic acids determined by fluorescence spectroscopy. *Soil Science*, 167:739-749.
- Mora V, Bacaicoa V, Zamarreño AM, Aguirre E, Garnica M, Fuentes M & García-Mina JM (2010) Action of humic acid on promotion of cucumber shoot growth involves nitrate related changes associated with the root-to-shoot distribution of cytokinins, polyamines and mineral nutrients. *Journal of Plant Physiology*, 167:633-642.
- Mora V, Baigorri R, Bacaicoa E, Zamarreño AM & García-Mina JM (2012) The humic acid-induced changes in the root concentration of nitric oxide, IAA and ethylene do not explain the changes in root architecture caused by humic acid in cucumber. *Environmental and Experimental Botany*, 76:24-32.
- Muscolo A, Sidari M & Nardi S (2013) Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, 129:57-63.
- Nannipieri P, Muccini L & Ciardi C (1983) Microbial biomass and enzyme activities: production and persistence. *Soil Biology and Biochemistry*, 15:679-685.
- Nardi S, Concheri G, Dell'Agola G & Scrimin P (1991) Nitrate uptake and atpase activity in oat seedlings in the presence of two humic fractions. *Soil and Biology and Biochemistry*, 9:833-836.
- Nardi S, Pizzeghello D, Muscolo A & Vianello A (2002) Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34:1527-1536.
- Peretyazhko T & Sposito G (2005) Iron(III) reduction and phosphorous solubilization in humid tropical forest soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69:3643-3652.
- Pérez MG, Martin-Neto L, Saab SC, Novotny EH, Milori DMBP, Bagnato VS, Colnago LA, Melo WJ & Knicker H (2004) Characterization of humic acids from a Brazilian Oxisol under different tillage systems by EPR, ¹³C NMR, FTIR and fluorescence spectroscopy. *Geoderma*, 118:181-190.
- Piccolo A (2001) The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, 166:810-832.
- Piccolo A, Conte P & Cozzolino A (1999) Conformational association of dissolved humic substances as affected by interactions with mineral and monocarboxylic acids. *European Journal of Soil Science*, 50:687-694.
- Pilanal N & Kaplan M (2003) Investigation of effects on nutrient uptake of humic acid applications of different forms to strawberry plant. *Journal of Plant Nutrition*, 26:835-843.
- Pinto JP, Gava CAT, Lima MAC, Silva AF & Resende GM (2008) Cultivo orgânico de meloeiro com aplicação de biofertilizantes e doses de substância húmica via fertirrigação. *Revista Ceres*, 55:280-286.
- Pinton R, Cesco S, Iacoletti G, Astolfi S & Varanini Z (1999) Modulation of NO₃⁻ uptake by water-extractable humic substances: involvement of root plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Soil*, 215:155-161.
- Puglisi E, Pascasio S, Suci N, Cattani I, Fait G, Spaccini R, Crecchio C, Piccolo A & Trevisan M (2013) Rhizosphere microbial diversity as influenced by humic substance amendments and chemical composition of rhizodeposits. *Journal of Geochemical Exploration*, 129:82-94.
- Quaggiotti S, Ruperti B, Pizzeghello D, Francioso O, Tugnoli V & Nardi S (2004) Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55:803-813.
- Rayle DL & Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology*, 99:1271-1274.
- Ribas LM, Baldotto MA, Canellas LP & Rezende CE (2008) Qualidade e mobilidade da matéria orgânica de sistemas adjacentes à Lagoa de Cima, Campos dos Goytacazes-RJ. *Geochimica Brasiliensis*, 22:103-112.
- Rivero C, Chirenge T, Ma LQ & Martinez G (2004) Influence of compost on organic soil matter quality under tropical conditions. *Geoderma*, 123:355-361.
- Rocha JC & Rosa AH (2003) Substâncias húmicas aquáticas: interações com espécies metálicas. São Paulo, UNESP. 120p.
- Rodrigues LFOS, Guimarães VF, Silva MB, Pinto Junior AS, Klein J & Costa ACPR (2014) Características agrônômicas do trigo em função de *Azospirillum brasilense*, ácidos húmicos e nitrogênio em casa de vegetação. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 18:31-37.
- Rovira PAS, Brunetti G, Polo A & Senesi N (2002) Comparative chemical and spectroscopic characterization of humic acids from sewage sludges and sludge-amended soils. *Soil Science*, 167:235-245.
- Saab SC & Martin-Neto L (2003) Use of the EPR technique to determine thermal stability of some humified organic substances found in soil organic-mineral fractions. *Química Nova*, 26:497-498.
- Santos G de A & Camargo FAO (1999) Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre, Gênese. 544p.
- Santos G de A, Silva LS, Canellas LP & Camargo FAO (2008) Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais. 2ª ed. Porto Alegre, Metrópole. 636p.
- Schiavon M, Pizzeghello D, Muscolo A, Vaccaro S, Francioso O & Nardi S (2010) High molecular size humic substances enhance henylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Chemistry and Ecology*, 36:662-669.

- Schnitzer M & Gupta UC (1965) Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Science Society of America Proceedings*, 29:274-277.
- Schnitzer M & Khan SU (1972) *Humic substances in the environment*. New York, Marcel Dekker. 327p.
- Schnitzer M & Levesque M (1979) Electron spin resonance as a guide to the degree of humification of peats. *Soil Science*, 127:140-145.
- Schnitzer M & Riffaldi R (1972) The determination of quinone groups in humic substances. *Soil Science Society of America Journal*, 36:772-777.
- Schwarzenbach RP, Stierli R, Lanz K & Zeyer J (1990) Quinone and iron porphyrin mediated reduction of nitroaromatic compounds in homogeneous aqueous solution. *Environmental Science & Technology*, 24:1566-1574.
- Scott DT, Mcknight DM & Lovley DR (1998) Quinone moieties act as electron acceptors in the reduction of humic substances by humics-reducing microorganisms. *Environmental Science & Technology*, 32:2984-2963.
- Shang C & Tiessen H (1997) Organic matter lability in a tropical Oxisol: evidence from shifting cultivation, chemical oxidation, particle size, density and magnetic fractionations. *Soil Science*, 162:798-807.
- Silva AC, Canellas LP, Olivares FL, Dobbss LB, Aguiar NO, Frade DOR, Rezende CE & Peres LEP (2011) Promoção do crescimento radicular de plântulas de tomateiro por substâncias húmicas isoladas de turfeiras. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 35:1609-1617.
- Silva RM, Jablonski A, Siewerdt L & Silveira Júnior P (2000) 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.
- Sondergaard TE, Schulza A & Palmgren MG (2004) Energization of transport processes in plants. Roles of plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 136:2475-2482.
- Spaccini R, Piccolo A, Conte P & Mbagwu JSC (2006) Changes of humic substances characteristics from forested to cultivated soils in Ethiopia. *Geoderma*, 132:9-19.
- Sposito G (2008) *The chemistry of soils*. 2nd ed. New York, Oxford. 330p.
- Stevenson FJ (1994) *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. 2nd ed. New York, Wiley. 496p.
- Struyk Z & Sposito G (2001) Redox properties of standard humic acids. *Geoderma*, 102:329-346.
- Stumm W & Morgan JJ (1996) *Aquatic chemistry: chemical equilibria and rates in natural waters*. 3rd ed. New York, Wiley-Interscience. 1022p.
- Sunda WG & Kieber DJ (1994) Oxidation of humic substances by manganese oxides yields low-molecular-weight organic substrates. *Nature*, 367:62-65.
- Sutton R & Sposito G (2005) Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environmental Science & Technology*, 39:9009-9015.
- Tejada M & Gonzalez JL (2003) Effects of foliar application of a byproduct of the two-step olive oil mill process on maize yield. *Agronomie*, 23:617-623.
- Thurman EM & Malcolm RL (1981) Preparative isolation of aquatic humic substances. *Environmental Science & Technology*, 15:463-466.
- Tombácz E, Libor Z, Illés E, Majzik A & Klumpp E (2004) The role of reactive surface sites and complexation by humic acids in the interaction of clay mineral and iron oxide particles. *Organic Geochemistry*, 35:257-267.
- Tossel JA (2009) Quinone-hydroquinone complexes as model components of humic acids: theoretical studies of their structure, stability and visible-UV spectra. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73:2023-2033.
- Tratnyek PG & Macalady DL (2000) Abiotic reduction of nitro aromatic pesticides in anaerobic laboratory systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3:248-254.
- Trivisan S, Botton A, Vaccaro S, Vezzaro A, Quaggiotti S & Nardi S (2011) Humic substances affect *Arabidopsis* physiology by altering the expression of genes involved in primary metabolism, growth and development. *Environmental and Experimental Botany*, 74:45-55.
- Trivisan S, Francioso O, Quaggiotti S & Nardi S (2010a) Humic substances biological activity at the plant-soil interface From environmental aspects to molecular factors. *Plant Signaling & Behavior*, 5:635-643.
- Trivisan S, Pizzeghello D, Ruperti B, Francioso O, Sassi A, Palme K, Quaggiotti S & Nardi S (2010b) 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.
- Valdrighi MV, Pera A, Agnolucci M, Frassinetti S, Lunardi D & Vallini G (1996) Effects of compost-derived humic acids on vegetable biomass production and microbial growth within a plant (*Cichorium intybus*)-soil system: a comparative study. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 58:133-144.
- Vaughan D & Malcolm RE (1979) Effect of humic acid on invertase synthesis in roots of higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 11:247-252.
- Visser SA (1985) Physiological action of humic substances on microbial cells. *Soil Biology and Biochemistry*, 17:457-462.
- Wangen DRB, Mendes LF, Sagata E, Silva HC & Shimamoto GF (2013) Fertilizante orgânico na produção de couve-da-malásia, *Brassica chinensis* var. *parachinensis* (Bailey) Sinskaja. *Enciclopédia Biosfera*, 9:1429-1435.
- Wershaw RL & Aiken GR (1985) Molecular size and weight measurements of humic substances. In: Aiken GR, Mcknight DM, Wershaw RL & Maccarthy P (Eds.) *Humic substances in soil, sediment and water*. New York, Wiley. p.477-492.
- Wershaw RL (1993) Model for humus in soils and sediments. *Environmental Science Technology*, 27:814-816.
- Xiaoli C, Shimaoka T, Xiaoyan C, Qiang G & Youcai Z (2007) Spectroscopic studies of the progress of humification processes in humic substances extracted from refuse in a landfill. *Chemosphere*, 69:1446-1453.
- Zech W, Senesi N, Guggenberger G, Kaiser K, Lehmann J, Miano TM, Miltner A & Schroth G (1997) Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*, 79:117-161.