Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Eficiência de uso de ^{15}N -ureia tratada com inibidores de urease em associação
com substâncias húmicas pela cultura do milho

Luís Felipe Rinaldi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2018

Luís Felipe Rinaldi
Engenheiro Agrônomo

Eficiência de uso de ^{15}N -ureia tratada com inibidores de urease em associação com substâncias
húmicas pela cultura do milho
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **PAULO CESAR OCHEUZE TRIVELIN**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Solos e
Nutrição de Plantas

Piracicaba
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Rinaldi, Luís Felipe

Eficiência de uso de ^{15}N -ureia tratada com inibidores de urease em associação com substâncias húmicas pela cultura do milho / Luís Felipe Rinaldi. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011, - - Piracicaba, 2018.

147 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Zea mays* L. 2. Nitrogênio 3. Fertilizantes de eficiência aumentada 4. Ácidos húmicos 5. Volatilização de amônia 6. Ácido bórico 7. Cobre 8. NBPT 9. Método isotópico I. Título

À minha mãe,

Silvia Regina Mimo, pela educação, carinho, incentivo e apoio em todos os momentos difíceis.

Ao meu avô,

Luiz Carlos Mimo (*in memoriam*), por me servir como exemplo de superação e humildade.

À todos meus amigos da República Alambique,

DEDICO E OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Ocheuze Trivelin pela confiança, excelente orientação e conhecimento compartilhado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ/USP pela oportunidade concedida e todo corpo docente pelos ensinamentos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA/USP, em especial ao Laboratório de Isótopos Estáveis-LIE, pelo suporte na condução do experimento e análises laboratoriais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pela concessão da bolsa de estudo (Processo nº 131194/2016-0) e recursos disponibilizados para o projeto (Processo nº 403358/2013-2).

À empresa Omnia Fertilizantes – Brasil pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Paulo Sérgio Pavinato pela concessão do espaço da casa de vegetação da ESALQ/USP.

Ao Prof. Dr. José Laércio Favarin pela liberação do Laboratório Multiusuário da ESALQ/USP para avaliação do sistema radicular e Renan Umburanas pelo auxílio no uso do equipamento.

À Prof^a. Dra. Renata Alcarde Sermarini pelo auxílio na análise estatística.

À toda equipe do Laboratório de Isótopos Estáveis – CENA/USP: Prof. Dr. José Albertino Bendassoli, Hugo Batagello, Ana Paula, Pingin, Cleber, Bento, Miguel, Magda e Cristina pelo suporte, amizade e troca de conhecimentos.

Aos estagiários: Gustavo Soares, Maick Gonzaga, Henrique Mendes, Mateus Rodrigues, Elis Dias, Letícia Fritsche, Milena Nishikawa, Catia Pereira, Catherine Zulian e Mayara de Andrade pela amizade e apoio.

Aos colegas de pós-graduação: Hugo Villalba, Beatriz Nastaro, Eduardo Mariano, Pedro Garcia, Bruno Moschini, Nicole Cheng, Saulo Castro, e pós-doutor Carlos Sant'ana pela amizade e troca de conhecimentos.

Aos amigos da República Alambique, em especial Daniel Salgado, Gabriel Alvarenga, Mateus Souza, Rafael Aguiar, Pedro Miguel, Guilherme Caus, Giulio Vecchi, João Marostica, Nedo Romiti, Caio Costa, Giovani Mariano, Camila Scavacini, D. Aurora, Lara e Dallas.

À todos que, embora não mencionados nominalmente, contribuíram direta ou indiretamente para realização desse estudo e conclusão desta etapa em minha vida.

MUITO OBRIGADO!

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”

John F. Kennedy

“O sucesso nada mais é que ir de fracasso em fracasso sem que se perca o entusiasmo”

Winston Churchill

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 A cultura do milho (<i>Zea mays</i> L.)	13
2.2 Importância socioeconômica do milho no Brasil.....	15
2.3 Nitrogênio na cultura do milho	16
2.4 Ureia como fonte de nitrogênio para as plantas	18
2.5 Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada.....	22
2.5.1 Fertilizantes nitrogenados “estabilizados” – inibidores de urease	24
2.6 Matéria orgânica do solo – origem das substâncias húmicas.....	31
2.6.1 Substâncias húmicas e não húmicas.....	32
2.6.2 Uso de substâncias húmicas na agricultura.....	36
2.7 Considerações gerais sobre o uso de SH na agricultura.....	44
2.8 Avaliação da eficiência do uso do N-fertilizante – Método direto com o isótopo ¹⁵ N..	45
3. MATERIAL E MÉTODOS	47
3.1 Local do experimento.....	47
3.2 Solo	47
3.3 Unidade experimental, tratamentos e delineamento estatístico	48
3.4 Características do híbrido de milho	52
3.5 Preparo, instalação e condução do experimento	53
3.5.1. Correção do solo e adubação de base.....	53
3.5.2. Semeadura, irrigação e adubação de cobertura.....	53
3.5.3. Aplicação dos tratamentos	54
3.5.4. Controle fitossanitário.....	55
3.5.5. Temperatura e umidade relativa do ar.....	56
3.6 Avaliações.....	56
3.6.1 Quantificação da volatilização de NH ₃	57
3.6.2 Medições de crescimento, área foliar, valor SPAD e produção de biomassa seca .	57
3.6.3 Análise morfológica do sistema radicular.....	58
3.6.4 Solo: determinações de N-total, abundância de ¹⁵ N e N-mineral (NH ₄ ⁺ e NO ₃ ⁻) ...	59
3.6.5 Planta: determinações de N-total e abundância de ¹⁵ N	60
3.7 Cálculos.....	61

3.7.1 Método isotópico	61
3.7.2 Métodos indiretos	62
3.8 Determinação do poder tampão das substâncias húmicas	63
3.9 Determinação do pH das substâncias húmicas e dos fertilizantes estabilizados	64
3.10 Análise estatística	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4.1 Perdas diárias e cumulativas de N por volatilização de NH ₃ (% do N aplicado)	65
4.1.1 pH das substâncias húmicas e dos fertilizantes estabilizados	76
4.1.2 Poder tampão das substâncias húmicas de leonardita	77
4.2 Avaliações de crescimento, valor SPAD e biomassa seca das plantas de milho	79
4.3 Avaliações morfológicas do sistema radicular	85
4.4 Eficiência de uso do N-fertilizante pelo milho	93
4.5 Balanço de ¹⁵ N no sistema solo-planta	99
5. CONCLUSÕES	103
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICES	137
ANEXOS	143

RESUMO

Eficiência de uso de ^{15}N -ureia tratada com inibidores de urease em associação com substâncias húmicas pela cultura do milho

A ureia (UR) é atualmente o fertilizante nitrogenado mais utilizado na agricultura brasileira. No entanto, quando aplicada na superfície do solo está sujeita a perdas de nitrogênio (N) por volatilização de NH_3 . Uma das formas de minimizar as perdas de N- NH_3 é o tratamento do fertilizante com inibidores de urease. A associação desses compostos com substâncias húmicas (SH), no tratamento da UR poderia aumentar a eficiência de uso dos nutrientes pelas plantas. O objetivo desse trabalho foi avaliar a eficiência de inibidores de urease, associados ou não com SH no revestimento da UR como fonte de N em cobertura para o milho. O experimento foi conduzido em casa de vegetação durante 62 dias em delineamento experimental de blocos ao acaso, com três repetições, no esquema fatorial completo, com UR recoberta três inibidores de urease (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; NBPT) e um tratamento adicional sem inibidor (Ausente), três doses de SH (0, 0,6, e 1,2%) e um controle. Os tratamentos com N constaram da aplicação de fonte única do nutriente [$\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$] aplicada em faixa e em superfície na dose de 180 mg kg^{-1} de N no estágio fisiológico V4 das plantas de milho. As plantas foram amostradas nos estádios V8 e VT do milho, respectivamente, aos 52 e 62 dias após a semeadura, quando foram avaliados: biometria de parte aérea, área foliar, biomassa seca de raízes e da parte aérea, caracterização morfológica do sistema radicular, e a eficiência de uso do N-fertilizante (EUN) pelo método do balanço isotópico (^{15}N). Também se quantificou as perdas de N por volatilização de NH_3 por meio de coletores semi-estáticos com espuma embebida em H_3PO_4^- para avaliação comparativa entre tratamentos. Embora a concentração mais elevada de ácido bórico na UR (0,64% B) tenha reduzido mais as perdas de NH_3 por volatilização em comparação ao 0,40 % B + 0,15 % Cu, isso não resultou em maior eficiência de uso do N-fertilizante pelo milho em VT, que ocorreu somente em V8. Em ambos os estádios, o NBPT apresentou-se como melhor inibidor de urease na ausência de SH. A aplicação de SH não aumentou a EUN pelo milho em V8 ou VT quando associados com 0,40% B + 0,15% Cu, 0,64% B, ou mesmo na UR convencional. Entretanto, quando associado com o NBPT, ocorreu aumento das perdas de NH_3 por volatilização e redução na EUN em VT, o que pode ter ocorrido devido ao elevado pH das SH (8,5-9) e ao seu baixo poder tampão. A aplicação da UR convencional ou revestida com inibidores de urease não aumentou a taxa de crescimento ou biomassa seca de raízes e parte aérea do milho em nenhum dos períodos avaliados quando comparado ao controle. Da mesma forma, não foram observadas diferenças expressivas entre tratamentos na caracterização morfológica do sistema radicular em V8 ou VT. A ausência de diferença entre tratamentos pode ser explicada pelo curto período de tempo entre a adubação de cobertura e as avaliações das plantas, à aplicação superficial das fontes recobertas com SH e ao método de irrigação adotado, que impediu que as SH entrassem totalmente em contato com as raízes da planta. Além disso, é possível, também, que a dose de SH empregada tenha sido muito baixa para ser efetiva.

Palavras-chave: *Zea mays* L.; Nitrogênio; Fertilizantes de eficiência aumentada; Ácidos húmicos; Volatilização de amônia; Ácido bórico; Cobre; NBPT; Método isotópico

ABSTRACT

Nitrogen use efficiency of ^{15}N -urea treated with urease inhibitors in association with humic substances by maize

Urea (UR) is the most widely applied nitrogen (N) fertilizer in Brazilian agriculture. However, UR is more prone to ammonia (NH_3) volatilization losses than other N sources when surface-applied. One alternative to improve nitrogen use efficiency (NUE) of surface-applied UR is through application of urease inhibitors as coating materials of UR. The association of these composts with humic substances (HS) as UR coating materials may also improve nutrient recovery by plants. The aim of this study was to evaluate the efficiency of urease inhibitors, associated or not with HS, as coating materials of UR as new top-dress N sources for maize. A greenhouse pot trial was carried out over 62 days with maize (*Zea mays* L.), in a completely randomized block design, with three replicates in a full factorial design, with UR coated with three urease inhibitors (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; NBPT) and one additional treatment without inhibitor, three doses of HS (0, 0.6, and 1.2%), and one control treatment. All treatments imposed had $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ as N source, application rate of 180 mg kg^{-1} of N, and side-dressing application at the V4 maize growth stage. Maize plants were assessed at V8 and VT growth stages, at 52 and 62 days after sowing, respectively, when it was evaluated: above and below-ground plant dry matter weight; leaf area; root morphological traits (length, surface area, and volume); and fertilizer use efficiency by the ^{15}N balance method. In addition, semi-open static collectors with foam discs previously soaked in H_3PO_4^- were used to quantify comparatively the NH_3 volatilized from all treatments. Although the addition of a higher dose of boric acid on UR (0,64% B) promoted lower ammonia losses by volatilization in comparison to 0,40 % B + 0,15 % Cu, it did not result in higher NUE by maize in VT, which occurred at V8. In both growth stages, NBPT presented the best performance as urease inhibitor in the absence of HS. The application of HS did not increase NUE by maize in V8 and VT when associated with 0,40% B + 0,15% Cu, 0,64% B or even conventional UR. However, when added in conjunction with NBPT, it increased ammonia volatilization and reduced NUE in VT which may have occurred due to the high pH of the HS (8.5-9) and low buffering capacity. Moreover, the application of conventional UR or UR treated with HS and urease inhibitors did not increase maize growth rate or shoot/root dry matter weight in comparison to the control treatment at both growth stages. Likewise, there was no major significant differences between treatments on root morphological traits (length, surface area, and volume) at both growth stages assessed. The lack of sizable outcome differences between treatments could be explained by the application of a single N dose, the short period of time between the side-dressing application and assessment of maize plants, and to the surface-application of the HS and method of irrigation which prevented HS to have full contact with maize roots. Furthermore, HS application rate may have been too low to be effective.

Keywords: *Zea mays* L.; Nitrogen; Enhanced efficiency fertilizers; Humic acids; Ammonia volatilization; Boric acid; Copper; NBPT; Isotopic method

1. INTRODUÇÃO

O milho é o cereal de maior volume de produção e consumo no mundo devido ao seu elevado potencial produtivo, composição química e valor nutritivo. No entanto, a produtividade média da cultura no Brasil ainda é muito baixa, sendo limitada, principalmente, pela disponibilidade de N para as plantas (YAMADA, 1997).

Nesse sentido, a ureia (UR) é atualmente o fertilizante nitrogenado mais utilizado na agricultura brasileira e mundial. No entanto, quando aplicada na superfície do solo está mais sujeita a perdas de nitrogênio (N) por volatilização de NH_3 em comparação com outras fontes nitrogenadas. Como consequência, caso não seja incorporada ao solo, resulta em menor eficiência de uso de N pelas plantas e em poluição ambiental devido às múltiplas formas de perdas. Por essa razão, pesquisas no Brasil buscam estratégias e tecnologias capazes de aumentar a eficiência da fonte nitrogenada, especialmente para aplicações em cobertura visando reduzir custos das operações necessárias para a incorporação do fertilizante ao solo.

Uma das formas de minimizar as perdas de NH_3 do solo e melhorar o aproveitamento de N pela planta é o recobrimento do fertilizante com inibidores de urease, compostos esses capazes de reduzir a taxa de hidrólise da UR no solo. O ácido bórico (H_3BO_3) e o cobre (Cu) têm apresentado resultados promissores como inibidores da urease, atuando na estrutura molecular da enzima e na afinidade química pelo substrato UR respectivamente, além dos compostos usados (ácido bórico e sulfato de cobre) conterem os micronutrientes essenciais B e Cu. (SHAW, 1954; BENINI et al., 2004; LIJUN et al., 2009; KRAJEWSKA & BRINDELL, 2016; GUELF, 2017). Entretanto, ainda não há na literatura resultados consistentes que demonstrem a concentração efetiva a ser empregada desses compostos. Além disso, supondo o maior poder de inibição da enzima pelo ácido bórico frente ao cobre, sua aplicação isolada certamente proporcionaria menor custo de produção na indústria, considerando-se o elevado custo de compra do composto sulfato de cobre. Embora alguns resultados indiquem que os compostos mencionados não sejam tão eficientes quanto o NBPT [N-(n-butil) tiofosfórico triamida], o inibidor de urease mais promissor e comercializado, atrasar e reduzir os máximos de volatilização de NH_3 , a valores próximos, poderia ser uma alternativa de alto custo-benefício considerando o maior preço da UR tratada com NBPT.

Uma outra estratégia em potencial e ainda pouco explorada para o aumento da eficiência de uso dos nutrientes pelas plantas na agricultura é o uso de substâncias húmicas (SH). No manejo de sistemas de produção, estudos relacionados à aplicação de fertilizantes minerais em associação com SH podem ser de fundamental importância, já que pesquisas

demonstram a capacidade das SH em estimular o crescimento radicular das plantas, devido ao efeito auxínico desses compostos (CANELLAS & FAÇANHA, 2004; TREVISAN et al., 2010), promovendo maior exploração do solo e consequente aquisição de nutrientes. Uma maior absorção de nutrientes permitiria reduzir a aplicação de fertilizantes minerais, gerando ganhos tanto ambientais quanto econômicos ao produtor (ROSE et al., 2014). Por outro lado, ainda há certo ceticismo por parte da comunidade científica a respeito da sua real eficácia devido a não obtenção de resultados consistentes já que, aparentemente, os efeitos proporcionados seriam influenciados pelas condições ambientais do local, além da própria fisiologia das plantas (BILLINGHAM, 2012). No entanto, considerando o enorme potencial que apresentam, bem como o crescente número de produtos comerciais tratados com SH, mais pesquisas ainda precisam ser conduzidas para obtenção de mais resultados cientificamente comprovados, para disponibilização de informações confiáveis aos produtores.

Ademais, considerando a redução da disponibilidade do fertilizante nitrato de amônio, o aumento pela dependência da UR e as elevações crescentes no preço do N, é fundamental o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de potencializar a eficiência da UR.

Diante do tema apresentado, foram levantadas as seguintes hipóteses:

- (i) O inibidor de urease NBPT é mais eficiente do que B + Cu ou somente B na redução das perdas de NH_3 por volatilização e na eficiência de uso de N.
- (ii) O aumento da concentração de H_3BO_3 (0,64 % B) no tratamento da UR promove redução nas perdas de NH_3 por volatilização da mesma ordem ou superior ao tratamento com B + Cu (0,40 % B + 0,15 % Cu).
- (iii) A aplicação de SH associada ou não à inibidores de urease no revestimento da UR aumenta o crescimento radicular e a eficiência de uso de N pelo milho;

Para testar as hipóteses formuladas, o presente estudo teve como objetivos:

- (a) Avaliar os efeitos da adubação do milho com UR tratada com inibidores de urease mais SH quanto a taxa de produção de biomassa seca, acúmulo de N pela parte aérea e sistema radicular e variações nos teores de N-NH_4^+ e N-NO_3^- no solo;
- (b) Estudar a influência das SH no crescimento radicular do milho e na eficiência de uso de N pela planta (^{15}N);
- (c) Analisar os impactos da associação de SH com inibidores de urease nas perdas de N por volatilização de NH_3 .

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A cultura do milho (*Zea mays* L.)

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea pertencente à família *Poaceae*, gênero *Zea* e designada pela espécie *mays* (L.). Atualmente, todos os milhos existentes abrangem essa única espécie e fazem parte da tribo *Maydeae*, que abrange sete gêneros, sendo dois provenientes do hemisfério ocidental (*Zea* e *Tripsacum*) e outros cinco nativos da Ásia. Acredita-se que seu centro de origem seja a América Central ou México e que tenha sido domesticado entre 8.000 e 10.000 anos atrás. Representada por uma ampla variedade de genótipos, a cultura apresenta grande adaptabilidade a diferentes ambientes de produção, podendo ser cultivadas em diversas regiões do mundo (FANCELLI, DOURADO-NETO, 2009).

O cultivo ocorre em regiões localizadas entre 58° de latitude Norte (Canadá e Rússia) a 40° de latitude Sul (Argentina) e distribuídas nas mais variadas altitudes, desde regiões abaixo do nível do mar (região do Mar Cáspio) até regiões com altitude de 2.500m como nos Andes Peruanos (FANCELLI, DOURADO-NETO, 2009). O milho é cultivado em regiões cuja precipitação varia de 300 a 5.000 mm anuais, sendo que a exigência da cultura durante o ciclo está em torno de 600 mm (ALDRICH et al., 1982). Para adequada germinação das sementes e emergência das plântulas, requer temperatura do solo entre 25 e 30°C e umidade próxima da capacidade de campo. Durante as fases de desenvolvimento vegetativo, floração e enchimento de grãos, o ideal são temperaturas do ar em torno de 25 a 30°C durante o dia, e noites variando de 16 a 19°C. Segundo EMBRAPA (2011a), a ocorrência de dias e noites quentes aceleram o ciclo e a perda de rendimento, ao passo que noites e dias frios estendem o ciclo sem vantagem para a produtividade final de grãos.

O milho é uma monocotiledônea de ciclo anual e de metabolismo fotossintético C₄, apresentando alta eficiência na utilização de luz e CO₂ em detrimento de um elevado gasto energético (BERGAMASCHI, 2004). Por essa razão, o milho é uma das plantas mais eficientes no armazenamento de energia e acúmulo de fotoassimilados. Partindo-se de uma semente de aproximadamente 0,3g, em nove semanas dando-se condições próprias para a germinação e crescimento, a planta de milho pode atingir mais de 2m de altura. Meses mais tarde, são produzidas cerca de 600 a 1.000 sementes similares aquela da qual se originou (EMBRAPA, 2011).

O milho trata-se de uma cultura cujo ciclo completo é extremamente variável, dependendo do genótipo e das condições ambientais ao longo de suas fases de desenvolvimento, principalmente da temperatura. É uma planta que responde ao acúmulo de energia térmica ou calor diário (graus-dia), ou seja, a mudança de uma fase fenológica para outra e seu ciclo como um todo é diretamente determinado pelo número de horas diárias de calor que a planta é capaz de acumular (VILLA NOVA et al., 1972). Os graus-dia podem ser calculados como a diferença entre a temperatura média diária e a temperatura base ou mínima exigida por uma espécie, no caso 10°C, para que a cultura de milho inicie seus processos fisiológicos (WISLIE, 1962). Abaixo da temperatura base o crescimento e o desenvolvimento do milho são reduzidos ou interrompidos. Embora todas as plantas de milho sigam um mesmo padrão de desenvolvimento, o período de dias entre os estádios e o número total de folhas desenvolvidas ao longo do ciclo de crescimento pode variar entre diferentes híbridos, safras, datas e local de plantio (EMBRAPA, 2011a). A adoção de uma escala baseada nas mudanças morfológicas da planta e nos eventos fisiológicos ao longo do ciclo de vida fornece maior segurança e precisão nas práticas de manejo e pesquisa. Sendo assim, o conhecimento detalhado de cada uma dessas fases e a maneira como cada uma interfere na produtividade final de grãos é de fundamental importância para o manejo adequado da cultura (FANCELLI, DOURADO-NETO, 2009).

Nas tabelas fenológicas, a diferenciação entre os estádios de crescimento e desenvolvimento, anteriores ao aparecimento das espigas, é feita pela contabilização do número de folhas completamente expandidas ou desdobradas. Desse modo, a folha do milho pode ser considerada como completamente expandida quando a linha de união lâmina-baínha (“colar”) estiver completamente visível (RITCHIE & HANWAY, 1989). Após emissão dos órgãos reprodutores e polinização, a identificação é feita com base no desenvolvimento e consistência dos grãos formados na espiga (KINIRY & BONHOMME, 1991). O sistema de identificação empregado divide o desenvolvimento da planta em vegetativo (V) e reprodutivo (R). Dentro da fase vegetativa foram estabelecidas subdivisões numéricas como V1, V2, V3 até Vn; onde “n” representa a última folha emitida antes da emissão do pendão (VT). O primeiro estágio vegetativo é representado por VE – emergência, e o último VT – pendoamento. A fase reprodutiva é identificada pelas fases: R1 (florescimento e polinização); R2 (grãos leitosos); R3 (grãos pastosos); R4 (grãos farináceos ou início da formação de “dentes”); R5 (grãos farináceos-duros); e R6 (grãos maduros fisiologicamente) (FANCELLI, DOURADO-NETO, 2009). O ponto de maturidade fisiológica, caracterizado pelo aparecimento de uma camada preta na interseção do grão com o sabugo e início da

senescência natural das folhas, marca o ponto de máxima produção ou acúmulo de massa seca (EMBRAPA, 2011a).

O potencial de produção das plantas de milho, ou seja, todas as folhas e espigas que a planta eventualmente irá produzir, são definidos entre os estádios V4 e V6, ao passo que o número de fileiras de grãos por espiga, o qual pode variar entre 12 a 24, é definido entre V7 e V9 (FANCELLI, DOURADO-NETO, 2009).

2.2 Importância socioeconômica do milho no Brasil

O milho é o cereal de maior volume de produção e de maior consumo no mundo devido ao seu elevado potencial produtivo, composição química e valor nutritivo. Por apresentar uma ampla variedade de aplicações, seja na alimentação humana ou animal, possui relevante papel socioeconômico, além de ser constituinte de uma série de produtos agroindustriais. O grão do milho tem composição média de 60% de carboidratos, 10% de proteína, 4% de lipídios, e o restante composto por minerais e vitaminas, sendo as proteínas constituídas por albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (FANCELLI, DOURADO-NETO, 2009; FORNASIERI-FILHO, 2007). Sua composição nutricional confere ao grão grande aptidão na alimentação animal “*in natura*” como forragem conservada no período da seca e fabricação de farelos. Na alimentação humana pode ser utilizado como fonte de amido, farinhas e óleo, além de ser constituinte de mais de 500 produtos (PONCIANO et al., 2003).

No Brasil, a cultura do milho ocupa posição socioeconômica de destaque sendo o país o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas de Estados Unidos e China, e o segundo maior exportador superado apenas pelos Estados Unidos (USDA, 2016). Em território nacional, é a segunda maior cultura de importância na produção agrícola, sendo superado apenas pela soja (*Glycine max* L.) em volume de produção. Para a safra 2016/2017, a produção brasileira de milho deverá alcançar um volume recorde de 93,8 milhões de toneladas, com elevação de 30,1% em relação à safra anterior de 66,5 milhões de toneladas, segundo levantamento realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2017). Em relação à área plantada, o levantamento também indicou um plantio de 17,3 milhões de hectares, incluindo primeira e segunda safra, contra 15,9 milhões de hectares da safra anterior, o que representa um aumento de 8,3%. Ainda que esses sejam números significativos em termos de produção e área plantada, a produtividade média brasileira ainda é baixa (5.400 kg ha⁻¹) quando comparada com China (5.810 kg ha⁻¹) e Estados Unidos (10.730 kg ha⁻¹) (USDA, 2016; CONAB, 2017).

O rendimento médio do milho depende de vários fatores assim como da interação entre eles (LATCOVIC et al., 2012). Entre os principais fatores para a baixa produtividade do milho no Brasil estão a baixa densidade de plantio, o plantio fora da época adequada, a adoção de cultivares com baixa adaptação a região ou sistema adotado, a correção e adubação sem análise química do solo, e aplicação de doses baixas de fertilizantes, especialmente fertilizantes nitrogenados em cobertura (EMBRAPA, 2009).

2.3 Nitrogênio na cultura do milho

A produtividade média de milho no Brasil ainda é muito baixa e a disponibilidade de N para planta é o que mais frequentemente limita a produtividade de grãos, pois é o nutriente absorvido em maior quantidade (YAMADA, 1997). Nesse sentido, o manejo do N é uma das práticas mais importantes para manutenção da sustentabilidade da produção dos sistemas agrícolas (AMADO, 1997).

A alta exigência pelo elemento é consequência da sua função estrutural e papel desempenhado na planta, pois é constituinte de diversos compostos orgânicos, como ATP, NADH, NADPH, proteínas de armazenamento, ácidos nucleicos, enzimas, moléculas de citocromos e clorofila (BÜLL, 1993, HARPER, 1994; LEMAIRE & GASTAL, 1997). O N é ainda essencial para realização de processos vitais, como síntese proteica, absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (MARSCHNER, 1995; MALAVOLTA, 2006).

As principais formas de N absorvidas pelas plantas são o amônio (NH_4^+) e o nitrato (NO_3^-), os quais constituem menos de 2% do N total dos solos. No caso do milho, o íon NH_4^+ é preferencialmente absorvido nos estádios iniciais de desenvolvimento e o NO_3^- nos estádios finais (WARNCKE & BARBER, 1973). Compostos nitrogenados simples de baixo peso molecular, como UR e alguns aminoácidos, também podem ser absorvidos, porém são pouco encontrados na forma livre no solo. Considerando que 95% ou mais do N total presente no solo encontra-se sob a forma de matéria orgânica, na avaliação da necessidade de adubação nitrogenada é importante considerar também o N que seria mineralizado durante o ciclo da cultura (CAMARGO et al., 1999). No entanto, de maneira geral, as recomendações de adubação nitrogenada são feitas com base em curvas de resposta, histórico da área e produtividade esperada, que está diretamente relacionada com a extração pela planta e exportação pelos grãos (COELHO et al., 2006; RAIJ, 2011).

O N tem papel direto no desenvolvimento das plantas de milho, proporcionando aumento significativo na área foliar, produção de massa de matéria seca, e consequentemente maior produtividade de grãos (UHART e ANDRADE, 1995). Trabalhos na literatura demonstraram a influência do nutriente no aumento do peso de mil grãos (FERREIRA et al., 2001; AMARAL FILHO et al., 2005), número de espigas por planta (FERNANDES et al., 2005); altura de plantas e peso de espigas (ARAÚJO et al., 2004); comprimento da espiga (BÜLL, 1993); do diâmetro do colmo (MAR et al., 2003); da produção de matéria seca (ARAÚJO et al., 2004; DUETE et al., 2008); e do crescimento radicular (BÜLL, 1993). Sua carência pode favorecer o surgimento de sintomas de deficiência na parte inferior da planta (folhas mais velhas), caracterizado pelo amarelecimento da ponta para a base em forma de “V”; secamento da ponta das folhas mais velhas avançando ao longo da nervura principal; necrose seguido de dilaceramento; e colmos finos (MALAVOLTA & DANTAS, 1987).

As quantidades extraídas variam substancialmente com os diferentes estádios de desenvolvimento, sendo menores nos estádios iniciais de crescimento, aumentando com o desenvolvimento da planta e alcançando o máximo durante o florescimento até o início da formação de grãos. O período crítico relativo à adequada nutrição nitrogenada no milho está entre V3 e V6, pois é quando se define o seu potencial produtivo; consequentemente, é a melhor época para se realizar a adubação nitrogenada de cobertura a fim de garantir a nutrição nitrogenada nessa fase, assim como na fase de definição do número de fileiras de grãos por espiga (V7 a V9) (FANCELLI, DOURADO-NETO, 2009). É nesta fase (V3 a V6) que o sistema radicular da planta, ainda em desenvolvimento, já apresenta considerável porcentagem de pelos absorventes e ramificações diferenciadas. O fornecimento de N nesse período estimula a proliferação das raízes, com consequente desenvolvimento da parte aérea. Além da definição do potencial de produção, é no estágio V4 que têm início o processo de diferenciação floral, o qual estimula o nascimento da panícula e da espiga. O não fornecimento de N nesta fase pode resultar em grandes perdas de produção (FANCELLI, 2010).

O milho é uma cultura que extrai grandes quantidades de N do solo devido ao seu elevado potencial produtivo. Por essa razão, usualmente, requer o uso da adubação nitrogenada em cobertura para complementar a quantidade fornecida pelo solo, quando se deseja produtividades elevadas. Para se ter uma base das quantidades exigidas pela cultura, o índice de colheita do milho, medida que quantifica a proporção dos fotoassimilados direcionada aos grãos e calculado pela razão entre o rendimento de grãos e a matéria seca total da planta, é de 0,6, ou seja, mais da metade do N acumulado na planta é exportado nos

grãos (MAGALHÃES et al., 2009). Em termos quantitativos, para cada rendimento de 1000 kg ha⁻¹ de grãos são extraídos pela planta cerca de 20 kg ha⁻¹ do solo e exportados 15 kg N t⁻¹ de grãos (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2007).

Estudos conduzidos no Brasil demonstraram que a concentração de N na parte aérea (palhada + grão) do milho, para produções máximas, é de 1,06% na palhada e 1,10% no grão (GROVE et al, 1980; COELHO et al., 1992). Para cálculo da dose de N a ser aplicada, sugere-se o valor de 1% de N na planta como adequado. Assim, para uma produtividade esperada de massa seca de 16 t ha⁻¹ ou de 9 t ha⁻¹ de grãos, por exemplo, o milho extrai do solo algo em torno de 160 kg ha⁻¹ de N. Levando-se em consideração a quantidade média de N fornecida pelos solos tropicais de 60 a 80 kg ha⁻¹ (GROVE, 1979; COELHO et al., 1991), seria possível produzir algo em torno de 5 a 7 t ha⁻¹ de massa seca ou 3 a 4 t ha⁻¹ de grãos. Solos cultivados com leguminosas e solos de áreas de primeiro ano de cultivo apresentam maior disponibilidade de N, exigindo menores doses de fertilizantes nitrogenados, por exemplo. De maneira geral, a prática mais adotada pelos produtores é a aplicação de no máximo 1/3 da dose total de N na base, dependendo da textura do solo e do regime de chuvas, e o restante a lançar ou incorporado entre os estádios V3 e V6. No caso de solos arenosos, devido ao menor teor de matéria orgânica e capacidade de troca de cátions (CTC), a dose é parcelada em 2 ou 3 vezes (FANCELLI & DOURADO-NETO, 2009).

Por fim, a fonte de N a ser utilizada é um fator decisivo no modo e época de aplicação para redução de perdas, aumento da velocidade de absorção e maior eficiência de aproveitamento do N-fertilizante. Para adubação na cultura do milho, são utilizadas basicamente três fontes de N: UR – CO(NH₂)₂, sulfato de amônio – (NH₄)₂SO₄, e nitrato de amônio – NH₄NO₃.

2.4 Ureia como fonte de nitrogênio para as plantas

Atualmente, a ureia (UR) é o fertilizante nitrogenado mais utilizado no Brasil (68%), seguido pelo nitrato de amônio (17%) e sulfato de amônio (13%) (IFA, 2014). Caracteriza-se como fertilizante sólido granulado com concentração em torno de 45% de N na forma amídica. Sua produção teve início no século XX com a descoberta da síntese da amônia (NH₃) a partir da reação do gás dinitrogênio (N₂) da atmosfera com o hidrogênio (H) de fonte não renovável (fóssil) em condições de alta pressão e temperatura, e na presença de ferro (ERISMAN et al., 2008). A descoberta do processo e registro da patente foi obtida pelos químicos Fritz Haber e Carl Bosch em 13 de outubro de 1908, reduzindo a dependência das

reservas de Guano no Chile por diversos países. Considerado o maior avanço tecnológico no setor de fertilizantes nitrogenados, o feito de Haber e Bosch possibilitou o aumento da produtividade das culturas e a segurança alimentar e nutricional da população (ERISMAN et al., 2008).

A descoberta da síntese da amônia possibilitou o desenvolvimento em maior escala dos principais fertilizantes nitrogenados utilizados na agricultura mundial que tem a amônia como precursora para sua produção, como a ureia, nitrato de amônio e sulfato de amônio. O processo de síntese da UR é feito combinando-se a amônia com o gás carbônico (CO_2), subproduto da sua síntese, enquanto que, para a produção de nitrato de amônio e sulfato de amônio reage-se o NH_3 com ácido nítrico e sulfúrico, respectivamente. Por envolver o próprio produto de sua síntese na reação e não envolver a adoção de ácidos o custo de produção da UR é menor comparado com as demais fontes (CANTARELLA, 2007).

O crescente uso da UR como fertilizante em culturas agrícolas pode ser atribuído a uma série de fatores como: I) elevada concentração de N (teor de 44 a 46% na forma amídica); II) menor custo por kg de N, conseqüentemente, também de transporte, estocagem e distribuição; III) facilidade no manuseio e aplicação; IV) elevada solubilidade em água; V) baixa corrosividade; e VI) boa compatibilidade com outros fertilizantes (LARA CABEZAS; KORNDORFER; MOTTA, 1997; KISS; SIMIHĂIAN, 2002). A desvantagem de uso dessa fonte é sua higroscopicidade e alta susceptibilidade a perdas por volatilização de NH_3 , principalmente quando aplicado superficialmente no solo em sistemas de conservação de palhada em superfície (CANTARELLA, 2007).

O N é um elemento altamente dinâmico na natureza, com grande variação no estado de oxidação e sujeito a várias transformações no sistema solo. Por isso, pode sofrer perdas por diversos processos e sair do sistema solo-planta por processos como volatilização, lixiviação, desnitrificação, escoamento superficial e pela remoção das culturas (DE DATTA, 1981). O processo de volatilização de NH_3 com a aplicação de UR tem início com a hidrólise da fonte nitrogenada por meio da enzima urease, resultando na formação de carbonato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3]$. A urease é uma enzima extracelular produzida por bactérias, actinomicetos e fungos do solo ou originada de restos vegetais, sendo sua atividade maior em resíduos vegetais comparados ao solo. No solo, a enzima é acumulativa e permanece adsorvida aos colóides do solo e em substâncias orgânicas (PAULSON; KURTZ, 1969). O carbonato de amônio resultante da hidrólise da UR é um sal instável que se decompõe em NH_3 , CO_2 e H_2O (KISS; SIMIHĂIAN, 2002). Ao ser formado, o NH_3 reage com os íons H^+ da solução do solo e com íons H^+ dissociáveis do complexo coloidal, resultando na formação de NH_4^+ . Uma vez

formado, o íon NH_4^+ , por ser um cátion, pode ser adsorvido temporariamente no complexo coloidal, passar para a solução do solo, ser absorvido pelas plantas, lixiviado ou oxidado a nitrato. No entanto, a reação da hidrólise da UR no solo consome prótons (H^+), podendo elevar o pH na região próxima aos grânulos para até 8,8, poucos dias após a adubação (OVERREIN & MOE, 1967; RODRIGUES & KIEHL, 1992). O mesmo não ocorre quando fertilizantes amoniacais de reação ácida ou neutra, como nitrato de amônio, sulfato de amônio, MAP (fosfato monoamônico) ou DAP (fosfato diamônico), são aplicados a solos neutros ou ácidos visto que o amônio permanece na forma iônica estável (CANTARELLA et al., 2001a; COSTA et al., 2003). Podem apresentar perdas por volatilização de NH_3 se aplicados na superfície de solos com pH alcalino. Assim, mesmo na maioria dos solos brasileiros onde predominam valores de pH menores que 6,3, a UR está sujeita a perdas de N por volatilização de NH_3 . A reação simplificada de hidrólise enzimática da UR em solos com pH menor que 6,3 pode ser descrita da seguinte forma (CANTARELLA, 2007):

Em solos com pH acima de 6,3, os produtos resultantes da hidrólise são o amônio e o bicarbonato:

Perdas de NH_3 também podem ocorrer por meio da formação de carbonato de amônio como produto da reação de hidrólise da UR no solo. Por ser uma molécula alcalina e instável, pode facilmente produzir gás de amônia, gás carbônico e água, como mostra a equação seguinte (KISS & SIMIHÄIAN, 2002).

No solo, a volatilização de NH_3 pode ser descrita pelas seguintes reações de equilíbrio (CANTARELLA, 2007).

Como mostra a última reação, valores elevados de pH desfavorecem a formação de íons NH_4^+ , consequentemente favorecendo a volatilização de NH_3 . Assim, qualquer fator

presente no sistema solo-planta que tenha influência sobre o pH influenciará as taxas de perdas (BYRNES, 2000). Havendo umidade e temperatura adequada para o crescimento das plantas, a taxa de hidrólise da UR é relativamente rápida, com o máximo de perdas por volatilização ocorrendo dois a quatro dias após sua aplicação. Já na presença de resíduos vegetais em superfície, a UR pode hidrolisar completamente já no primeiro dia após a aplicação (CANTARELLA et al., 2001a).

Outros fatores que também afetam a volatilização de NH_3 são: temperatura, umidade, trocas gasosas, a taxa de evaporação de água, o teor de água no solo, o pH, o poder tampão, a CTC, a classe textural, teor de matéria orgânica, presença de cobertura vegetal e a atividade da urease (TISDALE, 1984; FRENEY et al., 1985; HARGROVE, 1988; BYRNES, 2000). Em condições ótimas, como pH entre 7 e 8 e temperatura em torno de 55 °C, uma molécula de urease é capaz de promover a hidrólise de aproximadamente 500.000 moléculas de UR por minuto. No solo, a cada aumento da temperatura em 10 °C a taxa de reação da enzima quase duplica, até atingir a temperatura de 55°C (SOR; PELISSIER; LATHAM, 1971); contudo, o abaixamento da temperatura promove o efeito inverso, reduzindo a taxa de hidrólise e o potencial de perda por volatilização de NH_3 (ERNST & MASSEY, 1960). Além da temperatura, solos com maior poder tampão oferecem maior resistência ao aumento do pH decorrente da hidrólise da UR, e consequentemente têm menores perdas por volatilização. A CTC, a classe textural e o teor de matéria orgânica do solo (MOS) têm influência direta no poder tampão dos solos (TRIVELIN; LARA CABEZAS; BOARETTO, 1994b). Solos com alta CTC apresentam maior número de sítios de troca para reter o NH_4^+ produzido e menos NH_3 permanece em solução (NELSON, 1982). Por fim, a umidade inicial e a direção para a qual a água se move no solo também afetam sensivelmente a taxa e a quantidade de NH_3 volatilizada (KIEHL, 1989; RODRIGUES & KIEHL, 1992). Quantidades apreciáveis de NH_3 podem ser arrastadas do solo junto com o vapor de água quando a superfície do solo está secando. Porém, se as condições não forem favoráveis a evaporação, a umidade do solo pode permitir a difusão da UR no solo, reduzindo a volatilização de NH_3 . Até mesmo o orvalho pode fornecer água suficiente para que ocorra hidrólise da UR, e consequentemente, perda de NH_3 , mesmo se o fertilizante for aplicado em solo seco (CANTARELLA, 2007).

Diversos estudos conduzidos no Brasil e no mundo, com diferentes tipos de solos e culturas, mostraram altas perdas de N por volatilização de NH_3 após aplicação da UR em superfície. Vitti et al. (2002) relataram perdas de 40% do N aplicado sobre palhada de cana-de-açúcar; Cantarella et al. (2001a,b) registraram perdas de 16 a 61% do N aplicado em pastagens; enquanto Lara Cabezas (1997, et al., 1997, 2000) obtiveram perdas que variaram

de 40 a 78% do N aplicado na cultura do milho. O problema se torna mais grave em sistemas de plantio direto, já que a maioria dos produtores executam a adubação nitrogenada de cobertura com UR em aplicações superficiais e a lanço. A camada de palha em superfície incrementa o conteúdo de matéria orgânica, o que tende a aumentar a população microbiana e a atividade da urease (BAYER & MIELNICZUK, 1997).

Diversos trabalhos mostram que a maneira mais eficiente de reduzir ou eliminar as perdas por volatilização é a incorporação da UR no solo (LARA CABEZAS et al. 2000; TRIVELIN et al., 2002; ROCHETTE et al., 2009). A profundidade necessária para o controle de perdas depende de uma série de fatores como textura e CTC dos solos, umidade, e direção da água no perfil do solo, no entanto, a incorporação a 5 ou 10 cm de profundidade já é suficiente (CANTARELLA et al., 1999). Ao se difundir no interior do solo, a amônia encontra regiões com valores de pH mais baixos em relação aquele ao redor dos grânulos de UR, sendo novamente convertida a NH_4^+ (ERNANI, SANGOI; RAMPAZZO, 2002). No entanto, embora eficiente, a incorporação acrescenta um custo adicional a adubação, que pode se tornar mais alto em solos cobertos com grandes quantidades de palha, como no caso da cultura da cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo. Ademais, a incorporação do fertilizante aplicado na operação da adubação de cobertura necessita da abertura de um sulco, o que acaba estimulando a germinação de sementes de plantas invasoras. Dessa forma, a prática de incorporação se restringe a adubação realizada no momento do plantio já que a incorporação da UR em subsuperfície na adubação nitrogenada de cobertura podem também causar danos ao sistema radicular das culturas (RODRIGUES; KIEHL, 1986).

Dessa maneira, um dos grandes desafios das pesquisas com fertilizantes nitrogenados é o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de reduzir a magnitude da volatilização de NH_3 e melhorar o aproveitamento do N-fertilizante pela planta. Uma das estratégias mais utilizadas e que vêm promovendo melhorias na eficiência agronômica da adubação nitrogenada são os fertilizantes ditos de eficiência aumentada (TRENKEL, 2010; TIMILSENA et al., 2014).

2.5 Fertilizantes nitrogenados de eficiência aumentada

A concentração de formas solúveis de N na solução do solo ou das formas mais susceptíveis as perdas, em geral, estão relacionadas com as maiores perdas para o ambiente e o menor aproveitamento do N pelas culturas (CANTARELLA, 2007). Como forma de aumentar a eficiência de aproveitamento dos fertilizantes nitrogenados, iniciou-se em 1924 na

Europa e Estados Unidos os primeiros estudos com adubos nitrogenados quimicamente modificados ou de liberação lenta, surgindo então a ciclo diUR e a UR formaldeído (YAMAMOTO, et al., 2016). Com o passar dos anos e o avanço das pesquisas e da tecnologia, surgiram os nitrogenados de liberação controlada na década de 1960 e, pouco mais tarde, os nitrogenados “estabilizados” em 1990. Assim, recentemente, foi adotada pela Associação Americana de Agentes para o Controle de Nutrientes de Plantas (AAPFCO, em inglês) o termo “Fertilizantes de Eficiência Aumentada” para definir e classificar esses fertilizantes com características especiais (HALL, 2005). Fazem parte atualmente desse grupo: i) fertilizantes “estabilizados”; ii) fertilizantes de liberação lenta; e iii) fertilizantes de liberação controlada. Os preços seguem a seguinte tendência crescente: convencionais < estabilizados < liberação lenta < liberação controlada (GUELF, 2017).

Os fertilizantes nitrogenados ditos “estabilizados” contêm aditivos para evitar a rápida transformação do N contido na UR em formas de N menos estáveis em determinados ambientes, aumentando o tempo de disponibilidade de N no solo. O tratamento da UR pode ser feito com inibidores de urease, como NBPT [N-(n-butil) tiofosfórico triamida], hidroquinona, cobre, ácido bórico, e catecol; com inibidores de nitrificação, como DMPP (3,4-dimetilpirazole-fosfato), DCD (dicianodiamida), tiosulfato de amônio ou nitrapyrin, ou então com ambos no mesmo produto (CANTARELLA, 2007).

Os fertilizantes nitrogenados de liberação lenta ou quimicamente modificados são produtos oriundos de condensação da UR com aldeídos e têm como princípio a redução da solubilidade das frações de N contidas em sua composição (NEYMAN, DERR, 2002). O grupo inclui fertilizantes recobertos, encapsulados, insolúveis em água ou lentamente solúveis em água. Pertencem a essa categoria: UR formaldeído, UR metileno, isobultiraldeído diUR e ciclo diUR. A disponibilidade ou taxa de liberação de N do fertilizante depende da decomposição dos polímeros, em CO₂ e NH₃ por meio da atividade microbiológica, que por sua vez é afetada por fatores ambientais, como pH, teor de argila, umidade e temperatura (TIMILSENA et al., 2014). Quanto menor o tamanho da partícula, mais rápida será a liberação, e quanto mais ácido o solo, mais lenta será a decomposição (CANTARELLA, 2007). Esses produtos apresentam certa vantagem em relação as fontes solúveis nas situações em que o fornecimento gradual de N às culturas é desejado, como em culturas perenes, gramados, pastagens, etc. Segundo Neyman & Derr (2002), o tempo de lenta liberação fica entre 1,5 e 3 anos. Seu custo pode ser de 2 até 10 vezes mais caro que o da UR convencional por unidade de N (TRENKEL, 2010).

Os fertilizantes nitrogenados de liberação controlada são fertilizantes convencionais, como a UR que, após a granulação ou perolamento, são recobertos ou encapsulados com polímeros orgânicos termoplásticos ou resinas, ou com materiais inorgânicos, como enxofre elementar (SHAVIV, 2005). Esse grupo pode ser dividido em três categorias: i) fertilizantes revestidos com enxofre elementar (S^0); ii) fertilizantes revestidos com polímeros; iii) fertilizantes revestidos com enxofre elementar e polímeros. Diferentemente dos fertilizantes de liberação lenta, a liberação do N é pouco afetada pelas características do solo, como pH, temperatura, salinidade, potencial de oxirredução e atividade microbiana, mas depende da temperatura do solo e da permeabilidade do material de revestimento à água (TRENKEL, 2010). A taxa de liberação de N depende da espessura e da qualidade do recobrimento e pode ocorrer de duas formas: i) a água penetra no interior dos grânulos através de microporos, fendas ou imperfeições do material de recobrimento, aumentando a pressão osmótica no interior do grânulo. Isso provoca o esticamento da membrana do material de recobrimento e o aumento do tamanho dos poros facilitando a difusão do N para o solo; ii) oxidação da camada de enxofre pela atividade dos microrganismos (CANTARELLA, 2007). Seu preço pode ser 1,5 a 10 vezes maior que o da UR convencional (GUELF, 2017).

O futuro do mercado de fertilizantes de “eficiência aumentada” é bastante promissor. A capacidade de produção desses fertilizantes quase que dobrou de 2011 a 2014, passando de 6,5 para 11,6 milhões de toneladas, e a Ásia é o principal produtor e consumidor desses produtos. Os países da América Latina, especialmente Brasil, Argentina e Paraguai, também têm papel de destaque nesse mercado, representando o segundo maior mercado de expansão, atrás apenas da China. (APOSTOLOPOULOU, 2016). Por fim, pesquisas ainda indicam que a capacidade mundial para produção deverá crescer 7,5 milhões de toneladas (APOSTOLOPOULOU, 2016).

2.5.1 Fertilizantes nitrogenados “estabilizados” – inibidores de urease

O uso de inibidores de urease para reduzir a velocidade ou taxa de hidrólise da UR e assim, as perdas de N por volatilização é uma das tecnologias mais eficientes para aumentar sua eficiência e tem baixo custo (TRENKEL, 2010; TIMILSENA et al., 2014). Ao reduzir a atividade da urease no solo, os inibidores de urease reduzem a taxa de conversão do N na forma amídica ($N-NH_2$) para a forma amoniacal ($N-NH_4^+$). Essa estabilização temporária do N-amídico da UR pode proporcionar uma série de benefícios: I) atraso no máximo de volatilização e maior número de dias para incorporação do fertilizante pelas águas da chuva

ou irrigação; II) redução das perdas de N por volatilização devido a intensa taxa de hidrólise da UR na superfície do solo; III) melhor aproveitamento do N-fertilizante pelas plantas, aumentando a produtividade e qualidade das culturas (WATSON et al., 2008). O custo da UR tratada com inibidores de urease é 10 a 30% maior em comparação a UR convencional, sem aditivos (GUELF, 2017).

Apesar das diversas vantagens proporcionadas, pesquisas conduzidas no Brasil e no mundo têm mostrado que os inibidores de urease não são capazes de controlar completamente as perdas de NH_3 quando a UR é aplicada na superfície dos solos. Isso ocorre, uma vez que a eficiência do inibidor depende das condições edafoclimáticas, nem sempre previsíveis, na área de cultivo, como pH, textura e matéria orgânica do solo, evapotranspiração, temperatura, umidade relativa do ar e velocidade do vento (CANCELLIER et al., 2016; SILVA et al., 2017). Apesar das possíveis perdas de N por volatilização de NH_3 , é pouco provável que a UR venha a ser substituída por outro fertilizante em curto prazo. Por isso, o uso de inibidores de urease associados a UR ainda representam alternativa que não pode ser desconsiderada (CANTARELLA, 2007).

Desde 1977, centenas de compostos, orgânicos e inorgânicos, têm sido avaliados como inibidores de urease e os mais testados foram: fosforotriamidas, hidroquinona, catecol, cobre, ácido bórico e zinco (BREMNER, DOUGLAS, 1971). Os mais efetivos tem sido os análogos de UR, tais como fosforodiamidatos e fosforotriamidato, os quais mostram forte ação inibidora mesmo em baixas concentrações (RAWLUK et al., 2001), sem alterar as propriedades biológicas do solo (BANERJEE et al., 1999).

2.5.2 Fertilizantes nitrogenados tratados com NBPT

Como parte da família dos fosforotriamidatos, o NBPT é o composto mais eficaz na inibição da urease, pois apresenta características de solubilidade e difusividade semelhantes às da UR. Por essa razão, é atualmente o composto mais utilizado em produtos comerciais (CANTARELLA, 2007). O primeiro produto comercialmente disponível contendo NBPT foi o Agrotain (Koch Agronomic Services) estabilizador de N lançado em 1995. No Brasil, o produto foi oferecido em um primeiro momento por essa mesma empresa, que deteve, por algum tempo, a patente do produto. Após a quebra de patente do NBPT surgiram vários fornecedores do mesmo (SILVA et al., 2017). Atualmente, a dose comercial que mais vem sendo empregada é a de 530 mg kg^{-1} de NBPT na UR (CANTARELLA, 2007).

O NBPT não é o inibidor direto da urease. Primeiramente, ele precisa ser convertido em seu análogo de oxigênio (fosfato de N-n-butiltriamidas – NBPTO), por meio da substituição do grupo funcional $P = S$, presente na estrutura molecular do NBPT, por $P = O$, os quais se encontram ligados a pelo menos uma amida (NH_2) livre para reação com os sítios ativos da urease (DOMINGUEZ et al., 2008). Após formada, os átomos de O e NH_2 do NBPTO formam uma ligação tridentada com os átomos de níquel nos sítios ativos da urease e inativam a enzima (Figura 1). A conversão de NBPT para NBPTO leva minutos ou horas em solos arejados, mas pode levar vários dias em solos inundados (WATSON, 2000).

Ao ser tratada com o inibidor, a hidrólise da UR tende a ser mais lenta, favorecendo a difusão do fertilizante para o interior do solo e permitindo a reação do NH_3 produzido com a acidez do solo (CANTARELLA et al., 2005). Quando aplicado sobre a superfície do solo junto com a UR, o NBPT inibe a hidrólise do fertilizante por um período de três a 14 dias, dependendo das condições de umidade e temperatura. Nas condições edafoclimáticas do Brasil, o período de intensa inibição ocorre de três a sete dias após a aplicação; após esse período, o NBPT perde gradativamente o seu efeito. O regime de chuvas, a temperatura e a acidez do solo são fatores determinantes para a eficiência do NBPT na redução da atividade da urease. Chuvas em um intervalo de três a sete dias após a aplicação da UR + NBPT ajudam a reduzir as perdas por volatilização, ao passo que solos ácidos e altas temperaturas contribuem para a degradação do inibidor (ENGEL; JONES; WALLANDER, 2011).

A eficiência do produto comercial está também diretamente relacionada ao uso do solvente do inibidor no preparo de UR com NBPT (ENGEL et al., 2013; ENGEL et al., 2015). Inicialmente, o solvente adotado para condições de clima temperado não se mostrou adequado para a persistência do produto em condições tropicais, como a do Brasil. No entanto, hoje, já são oferecidos pelo mercado UR tratada com NBPT em que o solvente já apresenta maior resistência ou persistência do princípio ativo ou inibidor de urease, mesmo se submetido a temperaturas mais elevadas, típicas do clima tropical do Brasil, tanto no armazenamento do produto como em sua exposição as temperaturas de campo (ENGEL et al., 2013; ENGEL et al., 2015).

Estudos conduzidos por Souza (2015) com UR + NBPT em áreas de cultivo de milho mostraram que as perdas de N por volatilização de NH_3 após aplicação em cobertura foram de apenas 8% do N aplicado. Assim, supondo uma aplicação de cobertura de 150 kg ha^{-1} de N, apenas 12 kg ha^{-1} de N foram perdidos por volatilização. Em comparação a UR convencional, foi observada uma redução de 78% nas perdas por volatilização. Somente cinco dias após aplicação do fertilizante em cobertura observou-se influência nas perdas de N por

volatilização, demonstrando efeito do inibidor no atraso e na redução das perdas de N. Em outro estudo realizado por Cancellier et al. (2016) em solo corrigido e com cultivo de milho, a aplicação de UR + NBPT promoveu redução de 18% nas perdas de N por volatilização; no entanto, isso não se refletiu em aumento na produtividade de grãos.

Em meta-análise realizada por Silva et al. (2017) envolvendo diversos estudos publicados entre 1990 e 2014, os autores caracterizaram o comportamento das perdas de NH_3 provenientes de UR convencional e UR tratada com NBPT aplicadas em superfície, assim como o efeito de ambos produtos na produtividade das culturas. Em termos quantitativos, a meta-análise registrou-se perdas de 31,0% para UR convencional e 14,8% para UR tratada com NBPT. O uso do inibidor também retardou a taxa de hidrólise da UR; sendo que, do total de NH_3 perdido, 50% ocorreu após 4,8 (UR convencional) ou 8,3 (NBPT) dias após aplicação do fertilizante.

Os resultados obtidos por Silva et al. (2017) também indicaram que, quando comparada à UR convencional, a UR tratada com NBPT reduziu as perdas de NH_3 por volatilização independentemente do pH do solo, classe textural, teor de C orgânico, dose de N aplicada, e concentração de NBPT aplicada sobre a UR. A maior eficácia do inibidor foi observada em solos com pH entre 6,5 e 7,5 (67,5% de redução) do que em solos ácidos ($\text{pH} < 5,5$) ou alcalinos ($\text{pH} > 7,5$). Também foi observado menor eficácia do NBPT na redução das perdas de NH_3 , de 64,3% para 41,2%, quando a dose de N aplicada foi superior a 160 kg ha^{-1} . Em termos de produtividade, a análise revelou um aumento potencial de 5,3% na produtividade das culturas após aplicação da UR com NBPT.

Figura 1 – Conversão de NBPT para NBPTO e seu modo de ação na inativação da enzima urease (GUELFI, 2017).

2.5.3 Fertilizantes nitrogenados recobertos com ácido bórico e cobre

Existem diversos estudos demonstrando o poder inibitório do ácido bórico e do cobre sobre a atividade da urease como materiais de revestimento da UR (BENINI et al., 2004; FARIA et al., 2013; GROHS et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2013; STAFANATO et al., 2013). Além de atuar como inibidores da enzima, os compostos usados no recobrimento da UR: ácido bórico e sulfato de cobre, são dois dos poucos materiais inorgânicos que podem atuar também como fonte de micronutrientes para as plantas. No entanto, apesar dos benefícios relatados, ainda há certas dúvidas por parte da comunidade científica a respeito da eficácia e concentrações necessárias para reduzir as perdas de N por volatilização.

Na década de 1970, uma patente americana descrita por Hendries (1976), citado por Heringer (2008), apresentou fundamentos teóricos para a adição de ácido bórico e cobre na UR para redução da atividade da urease e, conseqüentemente, a redução das perdas de N-NH₃. De acordo com a patente brasileira (HERINGER, 2008), depositada no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI), no processo de tratamento da UR, ácido bórico e sulfato de cobre devem ser adicionados nas proporções de 1,5-2,4% (0,26-0,42 g B ou 1,5-2,4g H₃BO₃) e 0,6-1,5% (0,6-1,5g Cu ou 0,14-0,36 g CuSO₄.5H₂O), respectivamente. Ainda segundo a patente, esses compostos podem ser adicionados por meio de dois métodos: I) dissolução da UR fundida antes da granulação ou perolação; ou II) depois da granulação/perolação por meio de sua mistura na forma de pó ($\leq 0,015$ mm) com a UR sólida (recobrimento do grânulo). Ainda segundo o protocolo, o princípio de redução nas perdas de NH₃ por volatilização seria explicado pela ação de inibição não competitiva do ácido bórico e competitiva do cobre sobre a enzima urease.

Contrapondo a fundamentação teórica estabelecida na patente Heringer (2008), Cancellier et al. (2016) observou por meio de cálculos estequiométricos que para cada 61 partes de ácido bórico são capturados apenas 42 partes de N [H₃BO₃ + 3NH₄OH → (NH₄)₃BO₃ + 3H₂O]. Dessa maneira, a adição de apenas 24 g kg⁻¹ de B justificada na patente não seria suficiente para promover reduções na volatilização, já que nesta concentração seria capturado apenas 3,4 kg de N-NH₃ de uma aplicação de 100 kg de UR. Ademais, o ácido bórico é classificado como ácido fraco, ou seja, não ioniza significativamente em solução aquosa, possuindo pKa 9,2 (SOARES, ALLEONI; CASAGRANDE, 2005). Por essa razão, quando adicionado em baixas concentrações como nesse caso, não promove tamponamento na concentração de H⁺ suficiente para neutralizar o NH₃ produzido ao redor dos grânulos da

UR. Portanto, o efeito de inibição da atividade da urease poderia ser melhor justificado pela inibição competitiva causada pelo ácido bórico (BENINI et al., 2004).

Ao contrário do procedimento descrito na patente PI 0700921-6A (HERINGER, 2008), Benini et al. (2004) afirma que, por apresentar estrutura molecular geometricamente semelhante à da UR, o ácido bórico compete pelos mesmos sítios ativos da urease, e é por isso considerado um substrato análogo. A enzima urease caracteriza-se pela presença de dois núcleos centrais de níquel (Ni) em sua molécula, estando cada um ligado a uma molécula de água. O mecanismo de inibição feito pelo ácido bórico ocorre quando a molécula $[B(OH)_3]$ é simetricamente posicionada entre os dois átomos de Ni, substituindo as duas moléculas de água a qual estavam ligados por dois átomos inibidores de oxigênio, enquanto um terceiro oxigênio restante aponta para o lado oposto do sítio da enzima (Figura 2) (KRAJEWSKA & BRINDELL, 2016).

Algumas pesquisas também têm apontado o uso de alguns íons metálicos como inibidores da enzima urease no solo (SHAW, 1954; TYLER, 1974; TABATABAI, 1977; CHAPERON & SAÚVE, 2007; SOARES, 2011). No estudo conduzido por Shaw (1954), estabeleceu-se a seguinte sequência decrescente de poder de inibição na atividade da urease: $Ag^+ \sim Hg^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} = Sn^{2+} = Mn^{2+} = Pb^{2+}$. Segundo Shaw (1954), a urease é composta por um ou mais grupos sulfidrilas em sua constituição como partes ativas da molécula. Dessa maneira, a inibição por íons metálicos ocorreria por meio da ligação desses metais com esses grupos, formando sulfitos insolúveis (Figura 3). O metal capaz de formar o composto sulfito mais insolúvel foi classificado como aquele com melhor poder de inibição.

Figura 2 - Esquema de estrutura molecular de urease natural (A) e urease inibida pelo ácido bórico (KRAJEWSKA & BRINDELL, 2016).

Figura 3 – Inibição provocada pelos metais (M) pela afinidade com grupos sulfidrila (S) da enzima urease (E). Adaptado de SHAW (1954).

Nota-se pela sequência de “toxidez” que alguns dos elementos são metais pesados capazes de contaminar os solos. Ao desconsiderá-los, percebe-se que o cobre (Cu^{2+}) seria o íon metálico com maior poder de inibição, além também de micronutriente para as plantas, mostrando-se assim o elemento mais compatível e eficiente entre os estudados. Outros pesquisadores afirmam que a inibição da urease pelo Cu^{2+} seria explicada também pela reação do elemento com o grupo sulfidrila da urease, bloqueando o sítio ativo da enzima e reduzindo sua atividade no solo (BENINI et al., 2004; CHAPERON; SAUVÉ, 2007; FU et al., 2009; CANCELLIER et al., 2016).

Por outro lado, Lijun et al. (2009) ao avaliar o efeito de diferentes concentrações de Cu^{2+} na cinética enzimática, observaram que, à medida que as concentrações de Cu^{2+} aumentavam a taxa de dissociação do composto enzima-substrato em enzima e produto ($V_{\max}$) decrescia constantemente, demonstrando uma correlação negativa. Embora, a elevação das concentrações de Cu^{2+} também tenha promovido o enfraquecimento da ligação enzima-substrato (valor K_m), os valores foram apenas ligeiramente alterados. Portanto, notou-se que o Cu poderia afetar apenas levemente a afinidade entre a urease e o substrato, sem causar alterações na configuração da enzima. A redução na atividade da urease no solo seria causada pela capacidade do elemento em inibir a dissociação do composto UR-urease. Assim, o mecanismo de reação seria melhor classificado como uma inibição competitiva irreversível.

Em um estudo conduzido por Stafanato et al. (2013) em casa de vegetação, quantificou-se as perdas de N por volatilização de NH_3 provenientes de UR pastilhada com adição de H_3BO_3 e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em diferentes concentrações. Ao término de 18 dias de avaliação, verificou-se que dentre os pastilhados contendo UR, B e Cu, o que apresentou as menores perdas de N- NH_3 foi o tratamento com a maior concentração de B (2% H_3BO_3 + 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Os demais fertilizantes pastilhados continham 0,5% H_3BO_3 + 2% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ e 0,5% H_3BO_3 + 0,5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em sua composição. Em comparação com a UR granulada convencional, a UR pastilhada com 2% de B promoveu redução nas perdas de

N-NH₃ de aproximadamente 54% do N total, ao passo que os demais tratamentos com 0,5% de B conseguiram reduzir as perdas em 21,7 e 31,8%, respectivamente. Além disso, notou-se também atrasos e redução no máximo de volatilização, os quais ocorreram entre o 3º e 5º dia após aplicação, enquanto que para UR convencional a maior perda foi observada já no 2º após aplicação do fertilizante. Faria et al., (2013) notou que a adição de H₃BO₃ (0,4 % B) + CuSO₄.5H₂O (0,14% Cu) no revestimento da UR foi eficiente na redução das perdas de N por volatilização de NH₃ em duas safras de milho. Aplicando o mesmo tratamento em cana-de-açúcar, Nascimento et al. (2013) obteve, em média, perdas por volatilização 75% menores que as obtidas na UR convencional; e 52% menor em comparação a UR revestida com enxofre. Já Grohs et al. (2011) afirmam que, embora a UR revestida com B e Cu tenha reduzido as perdas de N por volatilização em torno de 50% na dose de 120 kg ha⁻¹ N comparado a UR convencional aplicada no arroz irrigado, não houve benefícios à produtividade.

Apesar da obtenção de resultados positivos, alguns trabalhos como Bremner & Douglas (1971) e Tabatabai (1977) mostram que a efetividade dos compostos inorgânicos como inibidores da urease aparenta ser baixa e ainda não há resultados consistentes que demonstrem a concentração efetiva. Segundo Cantarella (2007), o grande impasse da utilização desses produtos é o fato de que apesar de serem eficientes na redução da volatilização de NH₃, não refletem esse resultado em aumentos de produtividade, o que não os torna vantajosos em termos econômicos.

2.6 Matéria orgânica do solo – origem das substâncias húmicas

Atualmente, existem diversas definições distintas de matéria orgânica do solo (MOS); no entanto, a mais amplamente aceita pela comunidade científica é aquela estabelecida pela Encyclopedia of Soil Science (2006), definindo MOS como “todos os derivados de materiais vegetais ou animais, incorporados ao solo ou dispostos sobre sua superfície, na forma viva ou não viva nos vários estágios de decomposição, mas exclui-se a parte aérea das plantas”. No entanto, por ainda não estar consensualmente definida, o conceito de MOS ainda é tema de discussão por pesquisadores e autores da área, os quais apresentam entendimentos diferentes do que seja MOS (DICK et al., 2009).

Segundo Stevenson (1984), inicialmente, a MOS pode ser dividida em duas frações: matéria orgânica viva e não viva. A matéria orgânica viva constitui cerca de 5% do carbono (C) orgânico do solo, e pode ser subdividida em outros três grupos: raízes de plantas (5-10%), macrofauna do solo (15-30%) e microrganismos do solo (60-80%) (CAMBARDELLA &

ELLIOT, 1992). Já a matéria orgânica não viva constitui os outros 95% restantes do carbono orgânico do solo, e pode ser subdividida em outras três frações: matéria orgânica leve (fração lábil), compostos orgânicos dissolvidos, e matéria orgânica estabilizada (húmus) (ABBRUZZINI, 2011).

A matéria orgânica leve ou fração lábil corresponde ao resíduo orgânico recentemente adicionado ao solo, podendo ser encontrado em diversas fases de decomposição e com tamanho de partícula maior que 53 μm (CAMBARDELLA & ELLIOT, 1992). Essa fração apresenta curto período de permanência no solo devido sua alta taxa de decomposição; por isso, possui grande relação com o manejo do solo (WOLF & SNYDER, 2003). Do ponto de vista agrônomo, sua principal atribuição é disponibilizar nutrientes as plantas por meio do processo de mineralização, promovido pelos organismos do solo (RESENDE et al., 2007).

2.6.1 Substâncias húmicas e não húmicas

Após a separação da matéria orgânica leve do solo, o húmus é a fração restante, e nele incluem-se as substâncias húmicas (SH) e não húmicas. As substâncias não húmicas constituem cerca de 10 a 15% da reserva total de C do solo, e consistem em grupos de compostos orgânicos bem definidos, como proteínas e aminoácidos, carboidratos simples e complexos, resinas, ligninas, lipídios, ácidos orgânicos, polifenóis, ácidos nucleicos, pigmentos, entre outros (PORTUGAL et al., 2008).

As SH contribuem com os outros 80-95 % do C orgânico total do solo e por isso representam o principal compartimento da MOS, constituindo 60% da reserva orgânica do solo (PORTUGAL et al., 2008, MUSCOLO et al., 2013). Podem ser definidas como materiais polidispersos e misturas complexas e heterogêneas, sem fórmula molecular definida, resultantes da decomposição e transformação de resíduos vegetais e microrganismos do solo por meio de reações químicas e bioquímicas (STEVENSON, 1994; MUSCOLO et al., 2013). Se considerado sua formação por fragmentos parcialmente modificados de compostos derivadas de plantas e microrganismos, as SH seriam então classificadas como supramoléculas estabilizadas por ligações fracas, e não mais como polímeros em forma de espiral estendida com ligações covalentes conforme a visão tradicional representada na Figura 4 (SIMPSON et al., 2002).

A alta reatividade das SH pode ser explicada pela presença de diversos grupos funcionais com oxigênio em sua estrutura como carboxilas, hidroxilas fenólicas, e carbonilas (SARGENTINI JÚNIOR et al., 2001; PORTUGAL et al., 2008), que interagem entre si

formando colóides agregados (PICCOLO, 2001; PINTON et al., 2009; SUTTON & SPOSITO, 2005). Representam o último grau de recalcitrância da MOS em relação a degradação microbiana devido sua alta complexidade química e forte interação com os colóides do solo. Por essas razões, decompõem-se de forma lenta e podem permanecer no solo por séculos ou até milênios resistindo ao ataque de microrganismos (KHAN, 1972; STEVENSON, 1994; CHRISTENSEN, 1996, MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Podem ser extraídas de diversas fontes, incluindo solos (NARDI et al., 2000; ZANDONADI et al., 2007), turfa (KASIM et al., 2009), vermicomposto e esterco de bovinos (CANELLAS et al., 2012), leonardita (PEIRIS et al., 2002), e lignito (DONG et al., 2009).

Embora muito estudada, pesquisadores afirmam que as SH são super misturas que nunca foram totalmente estratificadas em compartimentos puros por causa da complexa composição química estrutural de seus componentes (STEVENSON, 1994; CANELLAS & SANTOS, 2005; MUSCOLO et al., 2013). A identificação dessas frações da MOS é de extrema importância, pois pode auxiliar no desenvolvimento de estratégias que visem a preservação da MOS e tornem viáveis sistemas produtivos mais sustentáveis (SILVA & MENDONÇA, 2007).

A identificação das frações ou compartimentos da MOS pode ser realizada por meio de técnicas de fracionamento com base no grau de solubilidade em solução ácida e/ou alcalina e variação do valor de pH (CANELLAS et al., 2001). No entanto, vale lembrar que, os procedimentos para realização do fracionamento são simplesmente operacionais não havendo um ponto bem definido de separação entre essas frações em termos de características físico-químicas. Durante as etapas de extração, purificação e fracionamento das SH, ainda é possível que ocorram alterações na estrutura química dos componentes, mostrando que ainda não há uma técnica ideal de fracionamento das SH (ABBRUZINI, 2011).

Figura 4 – (A) Substâncias húmicas descritas como polímeros em forma de espiral estendida e estabilizados por ligações covalentes conforme a visão tradicional; e (B) substâncias húmicas descritas como supramoléculas (uma espécie de agregado) estabilizadas por ligações fracas (interação hidrofóbica, pontes de hidrogênio). No modelo apresentado, esferas vermelhas: íons metálicos; unidades em preto: polissacarídeos; unidades em azul: polipeptídeos; unidades verdes: cadeias alifáticas; unidades marrons: fragmentos aromáticos de lignina (SIMPSON et al., 2002).

As SH são formadas pelo processo de humificação e podem ser separadas por fracionamento químico segundo recomendações da International Humic Substances Society (IHSS) com base na solubilidade de seus compartimentos em meio ácido e alcalino (SWIFT, 1996) (Figura 5). A SISH recomenda um método baseado em 4 horas de extração com solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ à temperatura ambiente, na razão solo/extrator 1:10 (m/v). Contudo, diversos fatores podem influenciar no processo de extração e muitas questões ainda necessitam ser esclarecidas. Outros métodos de extração e fracionamento das SH também são utilizados, diferindo-se quanto ao uso das substâncias extratoras, relação massa da amostra/extrator, tempo de agitação, centrifugação e formas de purificação (PRIMO et al., 2011). Ao término do procedimento são obtidas basicamente três frações: a) os ácidos fúlvicos (AF); b) os ácidos húmicos (AH) e as huminas (HU). Apesar das SH serem quimicamente semelhantes, os compartimentos se diferenciam pela cor, massa molecular, e composição elementar – teores de C, O, H, N e S (STEVENSON, 1994).

Figura 5 – Procedimento de extração, purificação e obtenção das frações de SH segundo recomendação da SISH e adaptado por Barros et al., (1994).

Os AF possuem cor amarelo-parda e são os compostos de maior solubilidade entre as frações húmicas, sendo solúveis tanto em meio alcalino quanto em meio ácido. Também são o compartimento de maior reatividade e polaridade, tendo por isso forte relação com alterações nas propriedades químicas do solo. Além disso, apresentam maior polaridade e menor massa molecular (entre 1.000 e 5.000 Daltons) em comparação às demais frações (STEVENSON, 1994; SILVA & MENDONÇA, 2007). Por ser solúvel em qualquer valor de pH da solução, podem ser considerados a fração mais lábil das SH, além de serem extremamente móveis no solo, permitindo que formem complexos com cátions metálicos (BENITES et al., 2003). O grupo é formado por polissacarídeos, aminoácidos e compostos fenólicos, além de conter elevado número de grupamentos funcionais oxigenados (grupos carboxílicos e fenólicos) o que ajuda a explicar a maior reatividade da AF em comparação as outras frações (CANELLAS et al., 2001).

Os AH constituem-se como macromoléculas de elevada massa molecular (entre 2.000 e 1.300.000 Daltons), coloração castanho escura, alta solubilidade em meio alcalino diluído e baixa solubilidade em meio ácido (STEVENSON, 1994), esta última condição frequentemente encontrada em solos brasileiros. Tendem apresentar maior teor de C, menor de O, e teor similar de H em relação aos AF e HU (PICCOLO, 2002; CANELLAS & FAÇANHA, 2004). Comparados aos AF, contém maior concentração de grupos aromáticos e menor de grupos carboxílicos e C-O alquil, sendo por isso menos ácidos (CANELLAS et al., 2001; PICCOLO, 2002). De maneira geral, os AH são a fração reativa mais estável da MOS, sendo assim responsáveis pela maior parcela da capacidade de troca de cátions (CTC) em camadas superficiais do solo (CANELLAS et al., 2001). Por essa razão, as condições do ambiente e o uso e manejo do solo podem interferir diretamente na sua formação e decomposição, sendo, portanto, considerada marcador natural do processo de humificação (CANELLAS et al., 2003). Com relação a estrutura molecular, até meados dos anos 90's do século vinte, estudiosos acreditavam que as SH eram constituídas principalmente de anéis aromáticos policondensados com alto grau de substituição. Entretanto, ao analisarem por espectroscopia de ^{13}C -NMR, constataram que o grau de aromaticidade era menor do que acreditavam. Assim, um novo modelo estrutural para os AH foi estabelecido por Schulten e Schnitzer (1993), dessa vez ponderando o elevado número de porções alifáticas (Figura 6a). Quatro anos mais tarde, em 1995, um novo modelo estrutural dos AH, agora tridimensional (Figura 6b), foi proposto por Schulten e Schnitzer (1997), no qual são observados uma série de espaços vazios que poderiam armazenar tanto substâncias orgânicas, como carboidratos, lipídios, pesticidas, como compostos inorgânicos como argilas e oxi-hidróxidos.

Figura 6 – (a) Modelo conceitual de ácido húmico proposto por Schulten e Schnitzer (1993); (b) modelo tridimensional de ácido húmico também proposto por Schulten e Schnitzer (1997) evidenciando os átomos de carbono em azul, hidrogênio em branco, oxigênio em vermelho, e nitrogênio em preto. As letras A, B e C indicam os espaços vazios presentes na estrutura (SCHULTEN & SCHNITZER, 1993; SCHULTEN & SCHNITZER, 1997).

Como última fração, as HU constituem-se num aglomerado de substâncias húmicas e não húmicas intimamente ligada a fração mineral do solo, e insolúvel em qualquer valor de pH (SILVA & MENDONÇA, 2007). Apresentam baixa reatividade e, por estarem mais fortemente complexadas com a fração mineral em relação aos AH e AF, possuem importante papel na agregação das partículas do solo, além de representar a maior parte do C estabilizado do solo na maioria dos solos tropicais (BENITES et al., 2003).

2.6.2 Uso de substâncias húmicas na agricultura

Desde 1960, diversos tipos de materiais têm sido testados pelas indústrias de fertilizantes visando aumentar a eficiência de uso de nutrientes pelas culturas (TOMASZEWSKA et al., 2002), sendo um exemplo o uso das SH. Apesar de encontradas em praticamente todos os tipos de solos, apenas com variações no teor presente, muitas evidências indicam que práticas de manejo da agricultura moderna como o preparo e revolvimento de solo têm causado seu declínio (NOVOTNY et al., 1999; SHEPHERD et al. 2001). Reduções gerais nos teores de matéria orgânica do solo têm gerado preocupações na comunidade científica devido ao papel que desempenham na manutenção das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, e por consequência, na produtividade das plantas (LAL, 2004; SPARLING et al., 2006). Em virtude de sua rápida decomposição resultante das práticas modernas de manejo do solo, surgiu o interesse por parte da indústria de fertilizantes na fabricação de compostos derivados de SH para aplicação em sistemas de produção agrícola

visando minimizar os impactos da redução dos teores presentes no solo (PICCOLO & MBAGWU, 1997; QUILTY & CATTLE, 2001). No Brasil, por exemplo, têm se intensificado nos últimos anos o uso de SH extraídas de turfa e leonardita como fertilizantes na agricultura. No entanto, o uso comercial envolve apenas as frações AH e AF (ROSE et al., 2014).

Hoje, há um significativo número de evidências indicando que a aplicação exógena de SH pode melhorar a fertilidade do solo, principalmente por meio de sua complexa estrutura química capaz de facilitar as interações com uma variedade de minerais e outros compostos orgânicos do solo. Alguns dos benefícios e modificações no solo já documentados pelo uso de SH incluem melhorias na estrutura e agregação do solo, aumento do poder de tamponamento e CTC, aumento da capacidade máxima de retenção de água, aumento da disponibilidade de nutrientes imóveis no solo, como fósforo (P), ferro (Fe) e zinco (Zn), e redução da toxidez por alumínio e outros metais pesados (CHEN et al., 2004a; IMBUFE et al., 2005; PEIRIS et al., 2002; PICCOLO & MBAGWU, 1989; PICCOLO et al., 1997; TAN & BINGER, 1986).

Além de poder influenciar indiretamente a produtividade das plantas por meio de modificações nas características do solo, as SH podem também causar impactos diretos nos processos físicos e metabólicos das plantas, sendo por isso classificadas como bioestimulantes, segundo a literatura internacional (HALPERN et al., 2014). Estudos conduzidos por Muscolo et al. (2013) e Lazzarini (2014) constataram evidências das SH em causar efeitos semelhantes aos hormonais nas plantas, destacando-se aqueles causados pela auxina, os quais seriam estimulados principalmente por estruturas não lignificadas presentes no material orgânico. A atividade auxínica seria desencadeada por meio de uma reação, tanto com a parte aérea quanto com as raízes das plantas. No caso das raízes, Trevisan et al. (2010) demonstraram que as SH seriam capazes de estimular as bombas de H^+ , a atividade da enzima H^+ -ATPase e a atividade transportadora de íons na membrana plasmática das raízes. Ambos efeitos melhorariam a aquisição de nutrientes, primeiro por meio do aumento da exploração do solo e depois pelo aumento na velocidade de aquisição de nutrientes. Canellas & Façanha (2004) também notaram forte estímulo no transporte de H^+ em membranas plasmáticas isoladas de raízes de milho. Em um outro trabalho, notou-se que o estímulo no transporte de prótons e o crescimento de raízes de plântulas de milho foi maior para o AH em relação ao AF (CANELLAS et al., 2010). Esses efeitos seriam ocorrentes principalmente após ação de SH derivadas de compostos e vermicompostos os quais conteriam substâncias vinculados a auxina (MUSCOLO et al., 1999; QUAGGIOTTI et al., 2004), incluindo derivados do ácido indolacético (AIA) e outros ácidos orgânicos de baixo peso molecular (RUSSEL et al., 2006). Outros trabalhos encontrados na literatura também demonstraram efeitos fisiológicos nas

raízes como: estímulo no crescimento de raízes (ZANDONADI et al., 2007), alteração na arquitetura do sistema radicular (DOBBSS et al., 2010; LAZARRINI, 2014), aumento do crescimento da parte aérea (MORA et al., 2014), aumento na absorção de nutrientes (QUAGGIOTTI et al., 2004; ÇELIK et al., 2010) e aumento da atividade da H⁺-ATPase (NARDI et al., 2002).

Em contrapartida, efeitos na parte aérea das plantas são menos documentados e parecem de alguma forma ser contraditórios. Apesar de haver um estudo em que a aplicação foliar de SH proporcionou aumento na concentração de clorofila nas folhas (SLADKÝ, 1959), também é sabido que as SH contêm um grande número de grupos funcionais capazes de interferir com a fotossíntese (PFLUGMACHER et al., 2006). Haveria também influência da aplicação foliar no processo de transpiração; no entanto, a forma como isso ocorre ainda não está totalmente esclarecida, sendo observados tanto aumentos como diminuições nas perdas de água e trocas gasosas pelas folhas (ROSE et al., 2014).

Apesar de todos os benefícios potenciais documentados em inúmeras publicações, ainda há certo ceticismo sobre a eficácia das SH na agricultura (BILLINGHAM, 2012). Parte da razão estaria na grande variedade de propriedades físico-químicas das SH, que variam com o método de extração, da fonte ou mesmo do local, no caso de turfas ou de minerais de onde foram extraídas. Sabe-se que as SH são formadas sob uma variedade de condições ambientais e, portanto, são altamente heterogêneas e difíceis de se definir estruturalmente (SENESI, 1994). Produtos comerciais, frequentemente, contêm misturas de materiais húmicos e adição de nutrientes minerais em sua composição. Por isso, as causas de qualquer efeito observado na planta não podem ser facilmente atribuídas as SH em si só. Além disso, as taxas de aplicação recomendadas pelos produtos comerciais são geralmente muito baixas em relação aos níveis naturais de SH presentes no solo. Consequentemente, o efeito de um produto com SH é consideravelmente menos previsível quando comparado a outros insumos de estrutura quimicamente conhecida aplicados na planta ou solo, como fertilizantes minerais ou orgânicos sintéticos como agrotóxicos e reguladores de crescimento. Ademais, devido aos diversos grupos funcionais presentes nas SH, um produto em particular contendo SH pode se comportar completamente diferentes sob diferentes condições ambientais ou quando aplicado em diferentes espécies de plantas. Por fim, assim como muitos outros produtos químicos aplicados na agricultura, o tempo, local, e taxa de aplicação são fatores cruciais para o bom ou mal desempenho do produto e se são economicamente viáveis (ROSE et al., 2014). No caso especial das SH, essas condições são particularmente importantes, já que pesquisas recentes têm destacado os potenciais efeitos negativos e questionado a viabilidade econômica da

aplicação de SH para melhoria da produtividade (ASLI & NEUMANN, 2010; de SANTIAGO et al., 2010; HARTZ & BOTTOMS, 2010).

Apesar do uso comercial das SH ser cada vez maior, os efeitos proporcionados a planta ainda são difíceis de se prever, podendo ser tanto positivos quanto negativos (QUILTY & CATTLE, 2011). Considerando um grande número de estudos publicados, chegou-se à conclusão de que, as SH, em geral, aumentam de 15 a 25% a biomassa de parte aérea e raízes das plantas (ROSE et al., 2014), porém a alta variação e a incerteza dos efeitos proporcionados podem representar riscos aos produtores. Por exemplo, aproximadamente metade dos estudos de respostas de biomassa seca de parte aérea e um terço para sistema radicular por não proporcionaram aumentos maiores que 5% em crescimento de planta (ROSE et al., 2014). Esses números evidenciam a grande necessidade ainda de se melhorar a consistência e a predição das respostas resultantes do uso das SH.

Um dos fatores que poderia afetar fortemente a resposta em crescimento da planta seria a fonte e o método de extração das SH. Chen et al., (2004a), por exemplo, atribui a alta variabilidade dos efeitos promovidos às diversas técnicas de extração e fracionamento químico utilizados antes da adoção de um procedimento padrão pela SISH. Sabe-se, por exemplo, que processos de extração, geralmente envolvendo tratamentos alcalinos, provavelmente provocam alterações químicas no material orgânico de origem (SWIFT et al., 1996). Já em relação a fonte, analisando diversos estudos, Rose et al., (2014) chegaram à conclusão de que o uso de SH extraídas de compostos orgânicos e resíduos verdes do solo promoviam mais efeitos positivos do que aquelas extraídas de turfa e carvão marrom. Lembrando que na categoria “carvão marrom” foram inclusas SH extraídas de lignito ou linhito, leonardita e carvão sub-betuminoso. Ainda segundo os autores, a diversidade de efeitos promovidos está provavelmente relacionada às diferentes estruturas químicas das SH proveniente de cada fonte, e também possivelmente aos nutrientes minerais co-extraídos remanescentes nas formulações de SH.

Analisando-se a estrutura química das SH, pesquisadores acreditam que o maior teor de N presente nos compostos orgânicos e resíduos verdes do solo em comparação ao carvão marrom e turfa pode ser um fator primário na promoção do crescimento (SIMPSON et al., 2003; ROSE et al., 2014). Primeiramente, a mineralização das SH pode disponibilizar N às plantas, e possivelmente outros nutrientes como fósforo (P) (ALVAREZ & STEINBACH, 2011; VALDRIGHI et al., 1996). Além disso, considerando que os compostos orgânicos e resíduos verdes do solo geralmente se encontram em um menor grau de humificação que a turfa e o carvão marrom, sua decomposição por atividades biológicas será provavelmente

mais rápida, e consequentemente também a disponibilização de nutrientes e efeitos de crescimento nas plantas (ROSE et al., 2014).

Embora essa explicação seja plausível para o caso de SH aplicadas em grandes taxas e com alto teor de N, o mesmo não ocorre em taxas menores. Uma avaliação dos efeitos das taxas de aplicação de SH provenientes de compostos orgânicos do solo mostrou uma boa correlação entre taxa de aplicação e crescimento de plantas quando aplicadas na faixa entre 25 e 750 mg kg⁻¹, havendo diminuição do efeito à medida que as doses aumentavam. Independente da fonte de extração, baixas taxas de SH não devem contribuir com N suficiente para promover efeitos de crescimento as plantas. Na presença de baixas concentrações de SH, um mecanismo alternativo ou talvez complementar envolveria estímulos no crescimento da planta por meio de atividades semelhantes à dos hormônios nas plantas (MUSCOLO et al., 2013). Esse efeito foi relacionado a presença de compostos contendo N, incluindo índoles como auxinas (NARDI et al., 2000) e poliaminas (YOUNG & CHEN, 1997).

Mais recentemente, um outro efeito relatado por Canellas et al., (2012) mostrou que estímulos no crescimento de raízes laterais por SH estava possivelmente atribuído a hidrofiliidade das SH, devido à presença em sua estrutura dos grupos funcionais O-alquil e metoxil/N-alquil identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear. As fontes de SH menos humificadas com maior quantidade de grupos funcionais polares nitrogenados e carboxílicos também apresentam elevada capacidade de quelação de micronutrientes como Zn, Cu e Fe (CHEN et al., 2004a), o que contribuiria para melhorar as condições de crescimento das plantas em certas condições (GARCIA-MINA et al., 2004). Como exemplo, um estudo conduzido por Azcona et al. (2011) mostrou que a aplicação de SH derivadas de compostos do solo promoveram maior crescimento e maturação de plantas de pimenta (*Capsicum annuum* L.) em comparação as SH extraídas de leonardita. Apesar das SH de compostos do solo possuírem maior teor de N (7,1%) que daquelas derivadas da leonardita (1,3%), os autores descartaram efeitos causados pela disponibilização de nutrientes (incluindo N), já que se forneceu adubação mineral adequada a todas as plantas. Dessa forma, acredita-se que os efeitos de crescimento foram provavelmente atribuídos as características orgânicas estruturais das SH e não do teor de N.

Apesar de todas pesquisas já conduzidas com SH na agricultura, o verdadeiro papel delas como estimulador de plantas ainda é fortemente debatido pela comunidade científica (CHEN et al. 2004a; TREVISAN et al., 2010) e a contribuição de resíduos nitrogenados na estimulação do crescimento das plantas não tem sido diretamente investigada (ROSE et al., 2014). Outra constatação feita por pesquisadores é de que SH provenientes de materiais

orgânicos mais jovens como aqueles derivados de compostos e solos, geralmente tem menor distribuição do peso molecular de moléculas e agregados, o que implicaria nas respostas iniciais da planta. Independentemente, é senso comum a necessidade de uma caracterização química e espectroscópica detalhada das SH utilizadas para permitir comparações adequadas entre diferentes estudos (CANELLAS et al., 2012; TREVISAN et al., 2010).

2.6.2.1 Aplicação direta de SH

Para o produtor rural, a principal decisão a ser levada em conta na aplicação de um insumo para o solo ou planta é a taxa que ele deve ser aplicado para obtenção da máxima eficácia com o mínimo de custo. O custo das SH está na faixa de US\$40-800 ton⁻¹ (QUILTY & CATTLE, 2011). Com base nesses números, uma aplicação de 100 mg kg⁻¹, equivalente a 100 kg ha⁻¹ na camada de 0 – 10 cm, teria um custo na faixa de US\$4-80 ha⁻¹. Em comparação, o custo de fertilizantes nitrogenados, é de aproximadamente \$1000 ton⁻¹ de N (USDA, 2013), ou seja, uma aplicação de 100 kg ha⁻¹ de N teria um custo aproximado de US\$100 ha⁻¹. Considerando que as respostas em produtividade à aplicação de fertilizantes nitrogenados são consistentes e lucrativas (LIU et al., 2006), o uso de SH em taxas superiores a 100 mg kg⁻¹ para o propósito de aumento da produtividade de biomassa não é interessante ou competitiva com os fertilizantes convencionais nos atuais preços (ROSE et al., 2014). O uso de altas taxas de SH pode ser justificado em áreas onde as condições ambientais são fator limitante ao crescimento das plantas, tendo maior eficácia para plantas em condições de estresse, por exemplo, para recuperação de solos salinos ou contaminados por metais pesados. A capacidade das SH em auxiliar as plantas a tolerar ou superar estresses também pode se aplicar ainda a condições de seca (ZHANG & SCHMIDT, 2000) ou controle de patógenos (LOFFREDO et al., 2008). Seja qual for a razão de uso, é preciso estar atento na identificação do fator ambiental limitante visando garantir que o estresse sofrido não seja agravado. Por exemplo, aplicações de SH superiores a 100 mg kg⁻¹ em solos deficientes em micronutrientes podem, na verdade, inibir ainda mais o crescimento da planta ao invés de estimular (ROSE et al., 2014).

Visando verificar se baixas taxas de SH (<100 mg kg⁻¹) seriam eficazes e, se sim, economicamente viável e vantajoso, Rose et al. (2014) analisaram diversos estudos com uso de SH provenientes de carvão marrom, fonte base utilizada na fabricação da maioria dos produtos comerciais. Foi constatado que a resposta de crescimento em baixas taxas é não linear, sendo melhor descrita como a soma de duas funções quadráticas. Em princípio,

observou-se um máximo inicial acentuado de crescimento entre 5-40 mg kg⁻¹ com a resposta mais alta ao redor de 20 mg kg⁻¹, seguido por um aumento mais gradual de crescimento de 40 a 200 mg kg⁻¹. Assim, para esse caso em específico, a faixa de 5-40 mg kg⁻¹ mostrou-se a mais adequada e economicamente viável para maximização do crescimento de plantas. Em outra pesquisa baseada na compilação e extrapolação de diversos resultados com uso de SH na agricultura, Chen, De Nobili e Aviad (2004) calcularam que a quantidade ideal requerida para uma aplicação via solo seria de 22,5 mg kg⁻¹, equivalente a 75 mg L⁻¹ de SH distribuídas em solo com 30% de teor de umidade. Analisando-se os valores encontrados nesse último estudo, constatou-se que se aproximam bastante daqueles encontrados por Rose et al. (2014).

Apesar de alguns estudos terem encontrado a melhor dose-resposta, as razões para a promoção de crescimento em baixas taxas de aplicação ainda não estão totalmente claras. Como comentado anteriormente, sabe-se que interação das SH com nutrientes essenciais as plantas como N, P e micronutrientes aumenta a disponibilidade de nutrientes e pode ser uma das razões para promoção de crescimento em baixas taxas. Caso confirmado, surge-se uma grande oportunidade agronômica de se aumentar a eficiência de uso de nutrientes provenientes dos fertilizantes, e não mais somente um produto para promoção de crescimento. Outras pesquisas ainda indicam que as SH podem interagir de maneira positiva com microrganismos benéficos do solo, permitindo ganhos adicionais em produtividade (CANELLAS et al., 2013).

2.6.2.2 Aplicação de SH como sinergistas

As propriedades químicas estruturais das SH, como domínios hidrofílicos e hidrofóbicos e características zwitteriônicas (composto químico eletricamente neutro, mas que possui cargas opostas em diferentes átomos) permitem que interajam com uma ampla variedade de constituintes do solo. Com base nessa descoberta, estudos recentes têm demonstrado que é possível explorar essas propriedades das SH visando desenvolver fertilizantes de liberação lenta ou controlada capazes de atender melhor a demanda da planta por nutrientes ao longo do ciclo (DAVIDSON & GU, 2012).

Atualmente, fertilizantes nitrogenados revestidos com AH estão disponíveis no mercado visando o aumento da eficiência de uso do fertilizante por vários mecanismos (CHEN et al., 2008). Estudos conduzidos por Alkanani et al., (1990) mostraram que as SH teriam a capacidade de reduzir significativamente a hidrólise da UR proveniente da mistura UR-nitrato de amônio, além de retardar a formação de NO₃⁻, pressupondo inibição da

atividade da urease e da nitrificação. A capacidade das SH em reduzir a hidrólise da UR em solos tratados estaria relacionada ao tamponamento biológico das SH em populações microbianas e atividades enzimáticas (DONG et al., 2009). O efeito tamponante poderia reduzir a perda de NH_3 proveniente da UR, aumentando a retenção de N na forma de NH_4^+ (KASIM et al., 2009). Apesar dos resultados positivos, os estudos foram realizados em laboratório com solos incubados e usando lignito como única fonte de SH. Por essa razão, resultados contraditórios poderiam ser obtidos em outras condições, evidenciando a necessidade de estudos adicionais em outras condições e fontes de SH (CANELLAS et al., 2010, ROSE et al., 2014).

Garcia-Serna et al. (1996) mostrou que AH (1% m/m) pulverizados na superfície de grânulos de UR retardaram a liberação de N por meio de mecanismos físico-químicos, porém não somente por atuar como uma barreira física, já que a curva se mostrou convexa e não côncava. Outras pesquisas ainda mostraram que além de retardar a formação e liberação de NH_4^+ , as SH ainda teriam a capacidade de reduzir a volatilização de NH_3 sem alterar drasticamente o pH, o principal responsável pelas emissões de NH_3 (KASIM et al., 2009). Ao comparar os efeitos da associação de um formulado NPK-SH, Erro et al., (2007) observou redução na volatilização de NH_3 , diminuição da lixiviação de N, e aumento do crescimento de plantas em comparação ao NPK controle. Em contrapartida, ao aplicar UR revestida com SH em sistemas de cultivo de arroz inundado, KIRAN et al. (2010) não encontraram aumentos na eficiência de uso de N, enquanto diversos outros fertilizantes de liberação controlada proporcionaram esse efeito nesse mesmo sistema. Por fim, Quaggiotti et al. (2004) e Fernandes & Souza (2006) constataram altas taxas de absorção de nitrato ocorrendo paralelamente ao aumento da atividade da enzima H^+ -ATPase na membrana plasmática das raízes. Isso leva a crer que, uma combinação de SH com o N-fertilizante poderia ser uma estratégia interessante para o aumento da absorção do nutriente, e consequentemente possibilitar o aumento da eficiência de uso de N pela planta. Tendo em vista a expansão do mercado com fertilizantes revestidos ou incorporados com SH, mostra-se cada vez mais necessárias novas pesquisas para validação desses produtos visando fornecer informações confiáveis aos produtores para que possam tomar a melhor decisão.

2.6.2.3 Influência dos fatores ambientais na eficiência das SH

Condições de estresse causadas por fatores ambientais como salinidade, toxidez por metais pesados ou deficiência nutricional, mais do que o tipo de planta, têm influência ainda

maior no papel das SH como promotoras de crescimento (ROSE et al., 2014). Essa descoberta tem relevância direta no uso agrônomo das SH já que problemas ambientais como degradação do solo, mudanças climáticas, redução da disponibilidade de recursos hídricos naturais e fontes de nutrientes tem limitado cada vez mais a produção agrícola, e recomendações de uso de SH são usadas cada vez mais com o intuito de aliviar essas condições de estresse às plantas (BILLINGHAM, 2012).

Estudos mostram que devido à alta CTC das SH, taxas de aplicação superiores a 200 mg kg⁻¹, independentemente da fonte, poderiam aliviar estresses causados por salinidade ou presença de metais pesados por meio de ligações com o excesso de cátions no solo (ROSE et al., 2014). Por outro lado, altas taxas de aplicação também poderiam esgotar as reservas de micronutrientes disponíveis no solo agravando deficiências das plantas por micronutrientes, como observado pela reduzida absorção de Zn em estudos hidropônicos de Vaughan & MacDonald (1976). Considerando ambas situações, o tipo de estresse enfrentado é, portanto, um fator chave na eficácia das SH quando aplicada em altas taxas (ROSE et al., 2014). Infelizmente, o baixo número de estudos envolvendo o crescimento da planta em condições de estresse com baixas taxas de aplicação de SH impedem de tirar mais conclusões a respeito do assunto. No entanto, há evidências para sugerir que em baixas disponibilidade de micronutrientes, baixas taxas de SH podem, na verdade, ajudar a mobilizar micronutrientes, mas impedindo a absorção em excesso ou em níveis tóxicos (CHEN et al., 2004a; GARCIA-MINA et al., 2004; STEVENSON, 1994). Estudos mais recentes também mostraram que taxas menores que 100 mg kg⁻¹ de SH de composto também pode amenizar os efeitos de estresse na planta, pois tem a capacidade de estimular uma resposta antioxidante pelas raízes que aumenta a resistência da planta a outros estresses (GARCIA et al., 2012). De maneira geral, as reais consequências da interação entre fonte de SH, taxa de aplicação e condições de estresse, ainda são difíceis de se prever e quantificar, o que requer mais pesquisas para elucidar quais mecanismos específicos irão predominar, se os diretos ou os indiretos.

2.7 Considerações gerais sobre o uso de SH na agricultura

Embora, geralmente positivas, as respostas em crescimento de plantas as SH são influenciadas por uma série de fatores, tanto ambientais como de manejo. O que grande parte dos estudos indicaram é que a fonte de extração das SH tem forte impacto na promoção ou não do crescimento da planta. Outros fatores como a espécie de planta e as condições submetidas de estresses, apesar de em menor grau, também influenciam na resposta da planta

às SH. A interação entre cada um desses fatores juntamente com a taxa de aplicação das SH também tem impacto direto na resposta da planta, enfatizando ainda mais a complexidade da obtenção de resposta claras (ROSE et al., 2014). Esses fatos demonstram a necessidade de condução de mais pesquisas visando elucidar as relações entre estrutura e atividade das SH, e como elas podem ser melhor exploradas, seja por meio de aplicações diretas ou como sinergistas de fertilizantes químicos ou biológicos. Por exemplo, como lacuna de conhecimento na área, sabe-se que a taxa de aplicação é uma decisão extremamente crítica que pode afetar não somente o crescimento da planta, como também as margens de lucro do produtor. Outra dúvida que ainda não foi esclarecida é se as tendências observadas nos estágios iniciais de crescimento da planta irão se manter ao longo de todo o seu ciclo, convertendo-se em maior produtividade na colheita. Isso evidencia a necessidade de mais trabalhos na área visando definir a melhor fonte, momento, modo, e taxa de aplicação capazes de maximizar o crescimento e minimizar os riscos de perdas econômicas. A conclusão que se chega com resultados de estudos conduzidos até o momento é de que, embora as perspectivas de uso das SH como promotoras de crescimento em sistemas agrícolas sejam teoricamente fortes, investigações contínuas ainda são necessárias para obtenção do máximo potencial que elas têm a oferecer nas diversas condições ambientais (ROSE et al., 2014).

2.8 Avaliação da eficiência do uso do N-fertilizante – Método direto com o isótopo ^{15}N

Átomos que possuem o mesmo número de prótons e diferente números de nêutrons são chamados de isótopos do elemento. Os isótopos estáveis são aqueles que não emitem radiação e ocorrem na natureza em proporções quase constantes. Os valores podem ser expressos por abundância ou concentração isotópica (% em átomos do isótopo; $^{14}\text{N} = 99,634\%$ e $^{15}\text{N} = 0,3663$) e significam a porcentagem de um isótopo em relação a todos do mesmo elemento que ocorrem naturalmente. (TRIVELIN, 2004).

Isótopos estáveis podem ser empregados em pesquisas agrícolas em proporção diferente daquela encontrada na natureza, sendo nesse caso chamados de compostos marcados ou enriquecidos, ou então por meio de medidas das variações da abundância isotópica natural (RENNIE; PAUL; JOHNS, 1976; TRIVELIN, 1976; RENNIE, 1986). A metodologia isotópica permite estimar a eficiência de recuperação do N que foi aplicado via fertilizante, possibilitando distinguir a origem do elemento assimilado pela planta e a partição desse entre as partes da planta após ser absorvido (ANDREUCCI, 2007). Os valores finais de

concentrações de ^{15}N encontrados na planta variam de acordo com a abundância isotópica do solo e da variação causada pela adubação (ROBINSON; HANDLEY; SCRIMGEOUR, 1998; ROBINSON, 2001; CHOI et al., 2002).

No entanto, o método isotópico pode ser fortemente influenciado pelos fracionamentos ocorridos durante o ciclo do N. É possível que haja segregação ou efeito de “diluição” entre as formas isotópicas ^{14}N e ^{15}N durante os processos de fixação, volatilização, nitrificação, desnitrificação, imobilização (“*pool substitution*”) e assimilação de N pelas plantas. A não consideração desses processos pode resultar em uma recuperação errônea dos valores finais de ^{15}N (DELWICHE & STEYN, 1970; YONEYAMA, 1996).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Ciências do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), localizada no município de Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil (22° 42’47’’ Latitude Sul, 47° 36’ 30’’ Longitude Oeste e 578 metros de altitude), no período compreendido entre setembro e dezembro de 2016 (APÊNDICE A).

3.2 Solo

A amostragem de solo para fins de caracterização química e granulométrica foi realizada segundo metodologia proposta por Raij et al. (2001) e Gee & Bauder (1986), respectivamente. Amostras deformadas compostas representativas foram coletadas da camada de 0-0,2 m de um Latossolo Vermelho Amarelo Distrófico típico – LVAd (EMBRAPA, 2013) de textura média, referente ao Typic Hapludox, segundo classificação americana (SOIL SURVEY STAFF, 2014). O solo localiza-se em área experimental da ESALQ/USP, tendo sido anteriormente cultivado com a cultura da mandioca (*Manihot esculenta* L.).

A determinação do pH solo foi realizada com uso de solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} na relação 1:2,5 (solo: solução – m/v) (RAIJ et al., 2001). O teor de matéria orgânica do solo (M.O.) foi determinado indiretamente segundo método proposto por Walkley & Black, por meio da quantificação de íons Cr (III) por colorimetria, e posterior medição da intensidade da cor produzida por esses íons em solução (RAIJ et al. 2001). A extração dos íons fósforo (P), potássio (K), magnésio (Mg) e cálcio (Ca) foi feita com uso de resina trocadora de íons, e a posterior quantificação por colorimetria (P), fotometria de chama (K) e de absorção atômica (Ca e Mg). (RAIJ et al., 2001). O teor de enxofre (S) no solo foi determinado por meio da extração com fosfato de cálcio 0,01 mol L^{-1} e posterior quantificação por turbidimetria (VITTI et al., 1989). A acidez potencial do solo (H + Al) foi determinada pela medida do pH de equilíbrio da solução tampão SMP (SHOEMAKER; McLEAN; PRATT, 1961). O teor de alumínio (Al) trocável no solo foi determinado por meio da titulação do extrato de solo em KCl 1 mol L^{-1} com NaOH 0,025 mol L^{-1} (EMBRAPA, 1997). A capacidade de troca de cátions (CTC) a pH 7,0 foi quantificada pela soma de cátions trocáveis (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}) e conteúdo de H + Al. O valor da soma de bases (SB) foi obtido por meio da soma dos teores de

cátions permutáveis (K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+}), enquanto que a saturação por bases (V%) pela divisão do valor da SB pela CTC e multiplicação do resultado por 100. Para os micronutrientes Cu, Fe, Mn e Zn utilizou-se solução ácida de dietil-enotriamino-pentacético (DTPA) como extrator, enquanto que para B adotou-se o método de extração por água quente (RAIJ et al., 2001). A composição textural (areia, silte e argila) foi determinada pelo método do densímetro (GEE & BAUDER, 1986).

O solo apresentou as seguintes características químicas: pH $CaCl_2$ 5,4; 21 g dm^{-3} de matéria orgânica (MO); 27 mg dm^{-3} de P_{resina} ; 2,6 mmol_c dm^{-3} de K; 22 mmol_c dm^{-3} de Ca; 11 mmol_c dm^{-3} de Mg; 5 mg dm^{-3} de S- SO_4 ; 22 mmol_c dm^{-3} de H + Al; 0 mmol_c dm^{-3} de Al; 58 mmol_c dm^{-3} de CTC, 62 de V% ; 0 de m%; 1 mg dm^{-3} de Cu; 21 mg dm^{-3} de Fe; 2,9 mg dm^{-3} de Zn; 30,5 mg dm^{-3} de Mn; e 0,2 mg dm^{-3} de B. A composição textural do solo foi de 733 g kg^{-1} de areia total; 64 g kg^{-1} de silte; e 203 g kg^{-1} de argila.

Para obtenção da terra fina seca ao ar (TFSA) e sua utilização como substrato de cultivo, a terra coletada ficou secando ao ar por 15 dias, sendo em seguida peneirada em peneira de malha de 2 mm.

A capacidade máxima de retenção de água (CMRA) do solo foi de 0,1568 g H_2O / g de solo, sendo determinada conforme ISO (2003), subtraindo os valores do solo saturado com água pelo solo seco a 105°C. Para isso, adicionou-se 20g de solo em copos plásticos perfurados na base e selados com membrana (abertura de poros de 100 Mesh). Para saturar o solo, os copos foram posicionados em bandeja com água durante 3h e posteriormente, por mais 2h em área úmida para drenar a água livre. Ao final desse período, foram pesados e anotados os valores do solo saturado.

3.3 Unidade experimental, tratamentos e delineamento estatístico

As unidades experimentais foram constituídas de vasos plásticos de base circular de 19 cm de diâmetro, abertura de 26 cm de diâmetro, 23 cm de altura, capacidade de 15 L, sem dreno, preenchidas com 13 kg de TFSA (APÊNDICE A).

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso com 13 tratamentos e três repetições, no esquema fatorial completo $4 \times 3 + 1$, que corresponderam a quatro tratamentos com UR, sendo três com recobrimento de inibidores de urease (B + Cu; somente B; NBPT) e a UR convencional, sem recobrimento com inibidor, associados com três concentrações de recobrimento com SH (0, 0,6, 1,2%), além de um controle sem aplicação de N; sendo realizadas duas avaliações no tempo (nos estádios fenológicos do milho V8 e VT).

Dessa maneira, foram alocadas 26 unidades experimentais por bloco, sendo 13 por bancada (APÊNDICE A).

A aplicação das fontes nitrogenadas foi feita em faixa e na superfície do solo na dose de 180 mg kg^{-1} de N, segundo recomendações estabelecidas por Malavolta (1980) e Novais et al. (1991) para cultivos em vasos. A fertilização nitrogenada de cobertura foi realizada quando as plantas de milho se encontravam no estágio fenológico V4 (quatro folhas completamente desdobradas), aproximadamente 21 dias após a semeadura (DAS) (APÊNDICE B). No controle não houve aplicação de N mineral em superfície, somente na adubação de base na forma de sulfato de amônio (20 mg kg^{-1} de N) feita em todas unidades experimentais.

Dessa forma, os tratamentos empregados com UR foram os seguintes: 1) UR tratada com 0,40% B + 0,15% Cu ou 4 g B kg^{-1} de UR + $1,5 \text{ g Cu kg}^{-1}$ de UR, aplicados na forma de ácido bórico e sulfato de cobre, respectivamente, correspondente ao produto comercial de nome Nitro Mais®; 2) UR tratada com 0,40% B + 0,15% Cu + 0,6% SH; 3) UR tratada com 0,40% B + 0,15% Cu + 1,2% SH; 4) UR tratada com 0,64% B ou $6,4 \text{ g B kg}^{-1}$; 5) UR tratada com 0,64% B + 0,6% SH; 6) UR tratada com 0,64% B + 1,2% SH; 7) UR tratada com $530 \text{ mg NBPT kg}^{-1}$ de UR (530 ppm). No recobrimento com NBPT, utilizou-se solução contendo 13,52% de NBPT, de maneira que, para tratar 1 kg de UR foram gastos 4 g de solução; 8) UR tratada com 13,52% de NBPT + 0,6% SH; 9) UR tratada com 13,52% de NBPT + 1,2% SH; 10) UR convencional; 11) UR convencional + 0,6% SH; 12) UR convencional + 1,2% SH.

Como parte da caracterização físico-química da UR utilizada, os grânulos foram classificados de acordo com sua granulometria, utilizando peneiras padrão ABNT nº 6 e 10 (2,00 a 3,35 mm). A dureza dos grânulos de UR apresentou valor de 4,46 kgf, superior ao recomendado pelos órgãos de fiscalização que é de 2,3 kgf (IFDC, 1986; MAPA, 2013). A análise colorimétrica para determinação da concentração (%) de biureto, composto gerado no processo de aquecimento da UR que é tóxico às plantas quando em altas concentrações no solo (MIKKELSEN, 1990), apresentou valor médio de 0,8 % em peso do composto, abaixo do limite permitido por legislação. Todas as URs utilizadas como tratamento foram enriquecidas no isótopo ^{15}N com 0,85 % de átomos de ^{15}N [$\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$] para avaliação da EUN pela planta. Todo o processo de síntese e enriquecimento da UR granulada em ^{15}N foi realizado no Laboratório de Isótopos Estáveis (LIE) do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). As especificações de todos os tratamentos constam na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos tratamentos: inibidores de urease e doses de SH como materiais de recobrimento das UR aplicada em faixa em superfície na dose de 180 mg kg⁻¹ de N.

Inibidores de urease	N	B	Cu	SH
	%			
H ₃ BO ₃ + Cu	43,4	0,40	0,15	-
(22,9 g kg ⁻¹ H ₃ BO ₃ + 1,5 g kg ⁻¹ Cu)	43,4	0,40	0,15	0,6
	42,2	0,40	0,15	1,2
H ₃ BO ₃	44,1	0,64	-	-
(36,6 g kg ⁻¹ H ₃ BO ₃)	42,7	0,64	-	0,6
	41,4	0,64	-	1,2
NBPT	44,5	-	-	-
(530 mg kg ⁻¹)	45,8	-	-	0,6
	42,6	-	-	1,2
Sem Inibidor	45,5	-	-	-
	45,0	-	-	0,6
	44,3	-	-	1,2
Controle	-	-	-	-

A adoção do ácido bórico e do sulfato de cobre como materiais de revestimento da UR nas concentrações de 0,40% de B (4 g kg⁻¹ B ou 22,9 g kg⁻¹ H₃BO₃) e 0,15% de Cu (1,5 g Cu kg⁻¹) foram determinadas com base um fertilizante comercializado no mercado nacional (Nitro Mais[®]).

A dose de 0,64% de B (6,4 g kg⁻¹ B ou 36,6 g kg⁻¹ H₃BO₃) foi estabelecida tomando por base resultados de ensaio de volatilização conduzido previamente em sistema fechado, em condições de laboratório no LIE-CENA/USP (resultados não apresentados). Nesse experimento, foram empregadas diferentes concentrações e combinações de ácido bórico e sulfato de cobre como materiais de revestimento da UR visando encontrar a melhor combinação e concentração capaz de reduzir e/ou retardar ao máximo a volatilização de NH₃. A partir da dose comercial de 0,40% de B e 0,15% de Cu, foram testados de forma associada ou isolada, aumentos equidistantes crescentes e decrescentes de 0,12% de B, bem como reduções de 0,05 % de Cu. O experimento foi conduzido em blocos casualizados com três repetições. Em resumo, os tratamentos foram constituídos de um fatorial completo com cinco doses de B (0; 0,40; 0,52; 0,64; e 0,72% de B) e quatro doses de Cu (0; 0,05, 0,10; e 0,15% de Cu), mais tratamento adicional (sem fertilizante). As unidades experimentais foram compostas por câmaras fechadas estáticas (12,5cm de diâmetro) preenchidas com 800g de um Latossolo Vermelho Eutrófico (LVe) coletado na cama de 0-20cm de profundidade, mantido a 60% da capacidade máxima de retenção de água. Dentro do coletor foi adicionado recipiente

contendo 40 mL de solução acidificada de H_2SO_4 (0,25M) para captura do N-NH_3 . Ao longo de 26 dias, foram realizadas trocas de soluções em 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, 15, 20 e 26 dias após aplicação dos fertilizantes, o qual foi aplicado em superfície na dose de 1.884 mg de N (equivalentes a dose de 120 kg ha^{-1} de N aplicado em filete na cana-de-açúcar). Ao término das trocas, quantificou-se o N-NH_4^+ em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA – “Flow Injection Analysis”), conforme metodologia descrita por Reis et al. (1997) (APÊNDICE E). Os dados foram submetidos a análise de variância por meio de teste F, seguido de teste LSD para comparação de médias ($p \leq 0,05$). Os resultados do experimento de volatilização de NH_3 mostraram que o uso isolado de sulfato de cobre nas doses de 0,05 e 0,10% e 0,15% de Cu não se mostrou eficiente na redução das perdas de NH_3 por volatilização em comparação a UR convencional, até o terceiro dia. Enquanto isso, nos tratamentos em que foram empregadas doses isoladas de ácido bórico, constatou-se reduções significativas nas perdas de N-NH_3 em comparação a UR não tratada, proporcionando um atraso no máximo de perdas e atenuação das perdas diárias. A partir desses resultados, constatou-se que o aumento das doses de B resultou em menores perdas de NH_3 em comparação a UR convencional e o produto comercial (0,40% de B e 0,15% de Cu), sendo a dose de 0,64% de B a mais efetiva entre aquelas avaliadas.

A opção pela adoção do NBPT (530 mg kg^{-1} ou 13,52 %) como inibidor de urease no experimento foi fundamentada em seu amplo uso no mercado de fertilizantes e por, até o momento, ser reconhecido como o inibidor comercial de maior eficiência na agricultura. Até o momento, não foram relatadas pesquisas avaliando a eficiência do produto quando associado com SH de leonardita, como materiais de revestimento da UR.

Por fim, um último grupo de tratamentos sem a presença de inibidores de urease foi adotado visando avaliar a aplicação isolada das SH como material de revestimento da UR e suas implicações no processo de volatilização de NH_3 , bem como a eficiência de uso de N pela planta.

Para tanto, a UR granulada enriquecida no isótopo ^{15}N foi revestida com substâncias húmicas extraídas de leonardita australiana, com base no produto comercial KS 100® (APÊNDICE D). O produto tem como características químicas de composição: 15% de K_2O (m/m); 45 % de carbono orgânico total (m/m); 70% AH (m/m); 8% AF (m/m); condutividade elétrica de $0,37 \text{ mS cm}^{-1}$; pH 10; solubilidade de 140 g/L e densidade de $1,1 \text{ g cm}^{-3}$. As doses de SH adotadas como material de revestimento foram calculadas, relacionando-se a parte estrutural dos grânulos de UR, que variam entre 2,3 e 3,36mm, e a aderência do produto em sua superfície, contabilizando também a associação conjunta com os inibidores de urease. Em

muitas formulações, as doses empregadas de SH como aditivo de fertilizantes variam de 1 a 2%. Nesse caso, a dose de 1,2% foi estabelecida por ser a maior concentração viável de ser aplicada no revestimento da UR. Doses superiores (até 2%) poderiam ser utilizadas, no entanto, somente com aplicação líquida, o que acabaria não sendo interessante do ponto de vista da indústria na produção do fertilizante. Doses superiores a 1,2% também não seriam economicamente viáveis em razão do custo do material de origem, a leonardita. A dose de 0,6% de SH foi empregada como dose intermediária.

Para obtenção da $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ granulada revestida com os inibidores de urease e SH de leonardita, inicialmente a UR foi misturada em prato de granulação com óleo mineral na proporção de $0,004 \text{ g g}^{-1}$ do fertilizante para favorecer a aderência dos materiais de revestimento aos grânulos da $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$. Em seguida, estabeleceu-se a rotação do prato granulador com velocidade controlada de 10 a 30 RPM a fim de se evitar quebras nos grânulos do fertilizante (APÊNDICE A). Logo após, transferiu-se, sob agitação, as massas dos inibidores de urease e SH previamente pesados. Ao final, os grânulos de $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ revestidos foram secos no prato granulador com agitação e fluxo de ar (soprador térmico) à temperatura de 100°C . Ao término do processo, os grânulos de $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ foram armazenados em embalagens à vácuo até sua utilização (APÊNDICE B). Assim como o processo de síntese e enriquecimento da $\text{UR-}^{15}\text{N}$, todo o processo de revestimento do fertilizante foi realizado em sistemas de síntese de compostos enriquecidos em isótopos estáveis do LIE-CENA/USP.

3.4 Características do híbrido de milho

Optou-se pela utilização do híbrido de milho AG 8061 da Sementes Agrocere[®], devido à grande amplitude de uso no Brasil para produção de grãos e silagem de alto valor energético. O híbrido tem como características agronômicas: ciclo de maturação precoce, excelente sistema radicular e elevado potencial produtivo. Possui ainda a tecnologia VT PRO 2TM, que auxilia no controle da lagarta do cartucho (*Spodoptera frugiperda*), lagarta da espiga (*Helicoverpa zea*), e broca do colmo (*Diatraea saccharalis*), além de conferir resistência a aplicação pós-emergente de herbicidas que contém glifosato como ingrediente ativo. O tratamento industrial das sementes é composto por três produtos principais que visam garantir o alto poder germinativo das sementes: 1) fungicidas contendo os ingredientes ativos Fludioxonil 2,5% mais Metalaxil-M 1% para o controle de doenças como a podridão do colmo (*Colletotrichum graminicola*, *Diplodia maydis*, e *Fusarium graminearum*, etc.) e

podridão de *Fusarium* (*Fusarium moniliforme* e *Fusarium graminearum*); 2) inseticidas que contém os ingredientes ativos Tiametoxam 350 g/L (35% m/v) e Clotianidina 600 g/L (60% m/v) para proteção contra insetos encontrados no solo nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura; e 3) polímeros que visam garantir melhor distribuição e aderência dos produtos no tratamento por meio do encapsulamento da semente.

3.5 Preparo, instalação e condução do experimento

3.5.1. Correção do solo e adubação de base

A partir da análise química das amostras de terra, seguiu-se a recomendação de adubação para experimentos em vasos de Malavolta (1980) e Novais et al., (1991), visando o fornecimento dos macros e micronutrientes, bem como o ajuste da saturação por bases (V%). A determinação da quantidade de calcário a ser aplicada foi feita com base no método da saturação por bases de Raij et al., (2001), visando elevar a V% para 70, valor recomendado para a cultura do milho. Dessa forma, aplicou-se 0,27 g kg⁻¹ de calcário dolomítico (PRNT = 70%). Juntamente com o corretivo, também foram aplicados 200 mg kg⁻¹ de P, sendo 100 mg kg⁻¹ de P na forma de superfosfato simples e outros 100 mg kg⁻¹ de P como superfosfato triplo, além de 20 mg kg⁻¹ de N na forma de sulfato de amônio. Por fim, a fim de se evitar o efeito da salinidade do cloreto de potássio na germinação das sementes, optou-se pelo parcelamento da dose de 150 mg kg⁻¹ de K, aplicando-se uma parcela de 50 mg kg⁻¹ de K na base, e outras duas de 50 mg dm⁻³ de K em cobertura. A mistura das fontes de nutrientes com o substrato foi realizada com o auxílio de uma betoneira, visando maior homogeneização dos fertilizantes e calcário com a terra (APÊNDICE B). Após a homogeneização dos insumos, 13 kg de terra foram distribuídos por vaso, e água deionizada adicionada visando elevar a capacidade máxima de retenção de água do solo a 70%. Após isso, os vasos foram fechados com um filme plástico com pequenos furos e incubados durante um período de 20 dias.

3.5.2. Semeadura, irrigação e adubação de cobertura

Após os 20 dias de incubação, duas sementes de milho foram semeadas a um centímetro de profundidade em cada vaso, e as plântulas emergiram após quatro dias. Aproximadamente 11 DAS, passado o período de germinação e desenvolvimento inicial das plântulas, efetuou-se o desbaste, mantendo-se uma planta por unidade experimental (vaso).

Após a semeadura, visando manter 50% da CMRA em cada unidade experimental, os vasos foram pesados diariamente, com uso de uma balança eletrônica, e a água deionizada foi adicionada, sempre que necessário visando suprir as perdas diárias de água por evapotranspiração.

Além da adubação de base, também foram aplicadas soluções em cobertura contendo K, Ca e micronutrientes, seguindo a recomendação de adubação para experimentos em vasos com terra de Malavolta (1980) e Novais et al., (1991). Uma única solução com $0,7 \text{ mg dm}^{-3}$ de B (ácido bórico p.a.), $1,4 \text{ mg dm}^{-3}$ de Cu (sulfato de cobre p.a.), $3,5 \text{ mg dm}^{-3}$ de Mn (sulfato de manganês p.a.), e $4,5 \text{ mg dm}^{-3}$ de Zn (sulfato de zinco p.a.) foi preparada e aplicada aos 16 e 26 DAS. As duas parcelas restantes de K foram aplicadas em doses igualitárias de 50 mg dm^{-3} de K, sendo a primeira na forma de cloreto de potássio aos 16 DAS, e a segunda aos 26 DAS como sulfato de potássio, totalizando os 150 mg dm^{-3} de K recomendados. Devido ao aparecimento de sintomas de deficiência de Ca ao longo do período de condução do experimento, caracterizado pela dilaceração das margens das folhas superiores, também foram aplicados 250 mg kg^{-1} de Ca na forma de cloreto de cálcio. A respectiva dose foi parcelada em 5 de 50 mg kg^{-1} de Ca, e aplicada aos 22, 26, 30, 34, e 38 DAS com intervalos de 4 dias a fim de se evitar o efeito salino da fonte utilizada.

3.5.3. Aplicação dos tratamentos

A aplicação dos tratamentos foi realizada aos 21 DAS, quando as plantas de milho se encontravam no estágio V4 (quatro folhas completamente desenvolvidas). Importante destacar que é nesse estágio que as folhas e as inflorescências femininas ou espigas potenciais que a planta eventualmente produzirá estão sendo formadas (RITCHIE, HANWAY & BENSON, 1993). É considerado, portanto, um estágio fisiológico crítico por ser definidor do potencial produtivo da cultura, exigindo suprimento adequado de nutrientes, principalmente N. A aplicação dos tratamentos de cobertura nitrogenada foi feita, na superfície do solo, em faixas de 0,01m de largura, 0,26m de comprimento, e a 0,05m de distância do colo da planta de milho (APÊNDICE B).

Considerando a posterior colocação de coletores de volatilização de NH_3 cobrindo parte da faixa de fertilizante-N, a fim de evitar uma discrepância entre as quantidades de grânulos e, conseqüentemente, da massa de N na área abaixo do coletor, tomou-se o cuidado de aplicar a mesma quantidade em mg de N vaso^{-1} . Para que as doses de N fornecidas abaixo dos coletores fossem iguais, para todos os vasos, calculou-se a quantidade de fertilizante a ser

aplicada baseado na massa teórica de N de cada tratamento, comprimento total da faixa de aplicação e comprimento da faixa abaixo do coletor. Imediatamente após a aplicação dos tratamentos, coletores de volatilização de NH_3 foram colocados no centro da faixa de fertilizante para quantificação do NH_3 volatilizado. O coletor consistiu de um pote plástico de 6 cm de altura e 9 cm de diâmetro, contendo uma espuma circular de polietileno de 9 cm de diâmetro, 2 cm de espessura e $0,02 \text{ g cm}^{-3}$ de densidade (APÊNDICE B). A espuma foi posicionada horizontalmente na abertura do pote, a 1 cm da superfície do solo, com o apoio de três hastes plásticas fixadas no solo. A fim de capturar a NH_3 volatilizada, as espumas de polietileno foram embebidas em 9 mL de solução de ácido fosfórico ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$, contendo 5% de glicerina v/v). Foram realizadas trocas periódicas das espumas acidificadas aos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, e 15 dias após a aplicação dos fertilizantes-N (DAF), acondicionando-as em sacos plásticos devidamente identificados, e substituindo-as por novas espumas embebidas em ácido. Posteriormente, as espumas coletadas foram armazenadas em geladeira até realização das análises em laboratório.

Após a instalação dos coletores, o procedimento para irrigação dos vasos precisou ser modificado. Se anteriormente a aplicação de água deionizada se dava por toda superfície do solo, após a instalação dos coletores e durante todo o período de quantificação das perdas de NH_3 (15 dias), a adição de água precisou ser feita cuidadosamente do lado oposto da faixa de fertilizante-N. A mudança no procedimento foi tomada visando impedir a incorporação da UR no solo e consequente redução das perdas de NH_3 , o que poderia minimizar o efeito dos inibidores de urease. Ao fim dos 15 dias de avaliação com a retirada dos coletores, retomou-se o procedimento anterior de irrigação aplicando-se água deionizada por toda a superfície do solo nos vasos.

3.5.4. Controle fitossanitário

Em virtude do aparecimento de danos nas folhas provocados por trips (*Frankliniella williamsi*), caracterizado por pequenas raspaduras no limbo foliar, fez-se necessário a aplicação de Engeo™ Pleno – (141 g L^{-1} , 14,1% m/v), inseticida sistêmico de contato e ingestão, contendo o ingrediente ativo Tiametoxam. Considerando o histórico de aparecimento de ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) na casa de vegetação, adicionou-se na mesma solução o inseticida acaricida Kraft® 36 EC, contendo o ingrediente ativo Abamectina – (36 g L^{-1} , 3,6% m/v). Misturou-se óleo mineral aos inseticidas visando reduzir a tensão

superficial e facilitar a penetração do agrotóxico. Os produtos foram aplicados na dose de 2 ml L⁻¹ via pulverização foliar, aos 33 DAS.

3.5.5. Temperatura e umidade relativa do ar

Os dados de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) na casa de vegetação foram registrados a cada 15 minutos por meio de um *data logger* (modelo CR200, Campbell Scientific Inc., Logan, USA), durante todo o período de condução do experimento. Valores médios referentes ao período experimental constam na Figura 7.

Figura 7 – Valores médios de temperatura (°C) e umidade relativa do ar (%) no interior da casa de vegetação durante o período de tempo do experimento.

3.6 Avaliações

O experimento foi conduzido durante 62 dias e colhido no momento em que mais de 50% das plantas haviam atingido o estágio VT, também conhecido como estágio fenológico de pendoamento. Ao longo do período de condução, duas colheitas foram efetuadas: a primeira no estágio V8, fase em que é definida o número de fileiras de grãos nas espigas de milho (FANCELLI & DOURADOR NETO, 2009), e quando tem início o aumento da taxa de acúmulo de N nos híbridos modernos de milho, conforme observado nos resultados de experimentos de GAVA (2003), BENDER et al. (2013), e GARCIA (2017). A segunda amostragem foi realizada no estágio VT do milho, quando o último ramo do pendão está

completamente visível e os “cabelos” ainda não emergiram, período também em que a planta atinge o máximo desenvolvimento e crescimento, marcando o fim da fase vegetativa (FANCELLI & DOURADOR NETO, 2009).

3.6.1 Quantificação da volatilização de NH_3

Para extração da amônia retida nas espumas na forma de fosfato de amônio, pesou-se 10 béqueres com capacidade de 2 L, depois adicionou-se 450 mL de água deionizada em cada um, colocando uma espuma coletada em cada recipiente (APÊNDICE E). Em seguida, com a mão protegida com luva cirúrgica, as espumas foram comprimidas seis vezes, consecutivamente. A compressão das espumas permite que o NH_4^+ retido na espuma fique em solução aquosa. Após o processo de compressão, os béqueres foram pesados novamente numa balança de prato (precisão de 0,01g) e retirou-se uma alíquota de cerca de 50 mL para determinação do teor de N-NH_4^+ em sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) (APÊNDICE E). Todo o procedimento de extração foi efetuado segundo metodologia descrita por Batagello et al. (2014). O NH_4^+ extraído foi analisado por meio da formação de amônia em um meio alcalino, permeável em membrana hidrofóbica (PTFE), sendo o fluxo direcionado para uma cela de condutividade, conforme metodologia descrita por Reis et al., (1997).

3.6.2 Medições de crescimento, área foliar, valor SPAD e produção de biomassa seca

Nas colheitas, aos 52 DAS, no estágio V8, e aos 62 DAS, no estágio VT, determinou-se a altura das plantas, diâmetro médio de colmo e índice SPAD. Para medida da altura, utilizou-se fita métrica com divisões em milímetros, tomando como padrão a distância entre a linha de início de inserção das raízes adventícias na base do colmo até base da última folha superior com aurícula visível. O diâmetro de cada colmo foi medido com um paquímetro digital, posicionando-se a pinça do aparelho no centro do primeiro internódio do colmo visível, após a base de sustentação da planta.

As leituras das unidades SPAD foram realizadas na última folha superior completamente expandida, no sentido do ápice para a base da planta, no terço médio da lâmina, evitando-se a nervura central das folhas, com emprego do clorofilômetro portátil fornecido pela Yara International ASA, Noruega (N-TESTER). O medidor de clorofila utilizado é uma modificação da SPAD-502 Minolta® (MINOLTA CAMERA Co., 1989),

ambos com mesmo princípio de medição, no entanto com escalas diferentes de valores. Os valores obtidos por meio das leituras com o clorofilômetro N-TESTER foram transformados para o valor SPAD por meio da fórmula (Yara International ASA, Noruega): $SPAD = (NT + 90) / 15$, em que: NT corresponde ao valor obtido nas leituras do clorofilômetro (N-TESTER) (VIEIRA-MEGDA, 2013). O valor SPAD para cada unidade experimental foi obtido pela média de 30 leituras realizadas em cada planta.

Ao final dessas avaliações em V8 e VT, a parte aérea das plantas de milho foi cortada rente à superfície do solo e separadas em colmo, bainha, folha, e órgão reprodutivo (em VT) (APÊNDICE D). Imediatamente após a separação de cada parte da planta, as folhas foram levadas para laboratório para determinação da área foliar do limbo de folhas verdes no aparelho integrador de área foliar (modelo LAI-3100 – Li-COR, Lincoln, NE, USA), tomando-se o cuidado de ter as lâminas foliares ainda túrgidas. Para a determinação da produção de biomassa seca da parte aérea, todo o material vegetal de cada parte da planta foi seco em estufa ventilada a 65°C até obtenção de massa constante, e posteriormente trituradas em moinho tipo Wiley, e as amostras acondicionadas em frascos fechados de acrílico J7. As raízes foram cuidadosamente separadas do solo por catação manual, visando-se evitar danos estruturais, e em seguida lavadas em água corrente, sobre peneiras com malha de 1mm. Cerca de 10% da massa de raízes com umidade natural foram separadas e posteriormente utilizadas para as avaliações morfológicas do sistema radicular. A biomassa seca das raízes das parcelas de cada tratamento foi obtida da soma da massa de raízes secas em estufa a 65°C, que incluíam as raízes originalmente separadas para as avaliações morfológicas (APÊNDICE C).

3.6.3 Análise morfológica do sistema radicular

Durante o processo de separação manual das raízes, cerca de 10% do sistema radicular total de cada planta (parcela) foi amostrado, tomando-se o cuidado de coletar amostras representativas do sistema radicular, como um todo. Para cada planta, foram pesados em balança analítica de 1,5 a 3g de biomassa fresca, dependendo do tratamento, para avaliações morfológicas do sistema radicular. Após a pesagem, as raízes foram acondicionadas em frasco de vidro contendo etanol, com 70% de concentração (v/v) e armazenadas a 4°C, para minimizar alterações na estrutura das raízes e decomposição do tecido vegetal. Após 20 dias, o sistema radicular foi analisado por meio do software WinRhizo (Regent Instruments Inc., Quebec, Canada, 2000), acoplado a um *scanner* modelo Epson XL 10000, seguindo metodologia proposta por Bouma, Nielsen & Koutstaal (2000), com algumas adaptações. Para

o escaneamento e obtenção das imagens, as raízes foram posicionadas em cuba de acrílico com água, tomando-se o cuidado de evitar a sobreposição das mesmas. As imagens digitais foram obtidas com resolução de 400 dpi, não se fazendo necessário o uso de coloração das raízes para otimização do contraste das imagens (APÊNDICE C).

A partir da leitura de varredura feito pelo scanner, foram determinadas as seguintes variáveis: comprimento de raízes (m); área superficial (m²); diâmetro médio (cm); e volume de raízes (m³), comprimento específico (m g⁻¹) e diâmetro médio de raízes (mm). As raízes foram classificadas em classes de diâmetro e agrupadas em três categorias: muito finas (< 0,5 mm); finas (0,5 a 2,0 mm); e grossas (> 2,0 mm), seguindo metodologia proposta por Bhom (1979) para classificação por comprimento, área superficial e volume. O comprimento específico (CE; m g⁻¹) foi obtido pela razão entre o comprimento total e a biomassa seca de raízes (LIU, 2009).

3.6.4 Solo: determinações de N-total, abundância de ¹⁵N e N-mineral (NH₄⁺ e NO₃⁻)

Após a separação manual das raízes do solo de cada parcela, nos dois estádios de amostragem: V8 e VT, três subamostras de solo foram coletadas e acondicionadas em sacos plásticos para as seguintes determinações: a) N-total e abundância de ¹⁵N; b) N-mineral e c) teor de umidade do solo.

Para determinação das concentrações de N-total e abundância de ¹⁵N no solo, as subamostras de solo foram secas ao ar até massa constante e posteriormente moídas em moinho de bolas. Após a moagem, foram pesados 70-80 mg de solo finamente moído e acondicionados em cápsulas de estanho para análise em um espectrômetro de massas modelo Hydra 20-20 SerCon Co., UK, acoplado a um analisador automático de N ANCA-SGL (BARRIE; PROSSER, 1996) (APÊNDICE E). Após obtenção dos valores de abundância em % de átomos de ¹⁵N e % de N-total no solo, foram calculados: N total acumulado no solo (mg vaso⁻¹) (Equação 1); nitrogênio no solo proveniente do fertilizante (NSPF) expresso em % e g vaso⁻¹ (Equação 2); e recuperação do N-fertilizante (EUN), expresso em %, segundo Trivelin et al. (1994) (Equação 3).

Para as determinações do N-mineral do solo (N-NH₄⁺ e N-NO₃⁻), as subamostras de solos com umidade original foram armazenadas em refrigerador, a uma temperatura próxima de -15°C, até a realização das análises químicas, segundo recomendações de Mattos Junior, Cantarella & Raij (1995). A extração das formas inorgânicas de N do solo foi determinada em uma subamostra de 10 g em base úmida, a qual se adicionou 50 mL de KCl 2 mol L⁻¹ (solo e

solução extratora, na relação 1:5 – m/v). (BURESH; AUSTIN; CRASWELL, 1982). Após agitação por uma hora da mistura de solo e solução extratora em agitador horizontal, filtrou-se a solução e, a partir do extrato obtido, determinou-se a concentração de N-NH_4^+ nas amostras por meio de sistema de análise por injeção em fluxo (FIA), conforme metodologia descrita por Reis et al., (1997). As formas de N nítrico ($\text{N-NO}_3^- + \text{N-NO}_2^-$) foram determinadas simultaneamente por um método espectrofotométrico, no qual o nitrato é reduzido para nitrito por coluna de cádmio coperizado, e posteriormente reage com sulfanilamida em meio ácido, formando uma azo-composto (GINÉ et al., 1980) (APÊNDICE E). Considerando que o teor de nitrito é considerado mínimo, os resultados foram expressos somente como nitrato. O teor de umidade das amostras de solo foi mensurado depois da secagem das subamostras de solo a 105°C em estufa por 48h. Assim, os teores de N inorgânico no solo foram expressos com base na massa de solo seco em estufa, na forma de N-NO_3^- e N-NH_4^+ .

3.6.5 Planta: determinações de N-total e abundância de ^{15}N

Em cada tempo de amostragem, após o acondicionamento do material vegetal triturado em frascos plásticos, fez-se a pesagem e posterior análise do teor de N total e abundância de átomos de ^{15}N (%) de todos os compartimentos vegetais: raízes, colmo, folha, bainha, e órgão reprodutivo. Para amostras de raízes, colmo e bainha, foram pesados 10 mg, folhas 5 a 7 mg, e órgão reprodutivo 10 a 11 mg. Durante a pesagem, as amostras foram acondicionadas em cápsulas de estanho e depois levadas para análise em espectrômetro de massas modelo Hydra 20-20 SerCon Co., UK, acoplado a um analisador automático de N ANCA-SGL (BARRIE; PROSSER, 1996) do LIE-CENA/USP. Com os resultados de abundância em % de átomos de ^{15}N e % de N-total, foram calculados para cada compartimento vegetal: N total acumulado (mg planta^{-1}) (Equação 1); nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF) expresso em % (Equação 2) e g planta^{-1} (Equação 3); e a eficiência de uso do N-fertilizante (EUN), expresso em %, segundo Trivelin et al., (1994) (Equação 4). Para obtenção do N acumulado (mg planta^{-1}) e NPPF (mg planta^{-1}) de parte aérea e planta toda, realizou-se a soma dos valores individuais de cada compartimento vegetal.

3.7 Cálculos

3.7.1 Método isotópico

O nitrogênio total acumulado no solo (mg vaso^{-1}) e na planta (mg planta^{-1}) foi calculado pela seguinte expressão:

$$\text{N-total (mg vaso ou mg planta}^{-1}\text{)} = (a / 100) \cdot b \quad (\text{Equação 1})$$

sendo:

a = Nitrogênio total do solo ou na planta (%);

b = Massa seca de solo contido no vaso ou biomassa seca de planta (mg).

O nitrogênio no solo (% NSPF) ou planta (% NPPF) proveniente do fertilizante foi calculada da seguinte forma:

$$\text{NSPF (\%)} \text{ ou } \text{NPPF (\%)} = \frac{c - e}{c - d} \quad (\text{Equação 2})$$

onde:

c = Abundância de ^{15}N na planta ou solo (% de átomos);

d = Abundância de ^{15}N -fertilizante (% de átomos);

e = Abundância de ^{15}N do solo testemunha ou da planta testemunha (% de átomos).

O nitrogênio no solo (NSPF) ou planta (NPPF) proveniente do fertilizante, expressos em mg vaso^{-1} e mg planta^{-1} , respectivamente, foi calculado da seguinte forma:

$$\text{NSPF ou NPPF (mg vaso}^{-1}\text{ ou mg planta}^{-1}\text{)} = \frac{\text{NSPF (\%)} \text{ ou } \text{NPPF (\%)}}{100} \cdot \text{N-total} \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

N-total = Nitrogênio total acumulado no solo (mg vaso^{-1}) ou planta (mg planta^{-1}).

A recuperação de nitrogênio no solo (R%) e na planta ou eficiência de uso de N-fertilizante pela planta (R% ou EUN %) foi calculado pela seguinte expressão:

$$R(\%) \text{ ou } EUN(\%) = \frac{NSPF \text{ ou } NPPF \text{ (mg/vaso ou mg/planta)}}{f} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde:

f = Dose de N proveniente da $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$ aplicada em superfície.

3.7.2 Métodos indiretos

Com os dados de produção de biomassa seca de raízes e da parte aérea e o acúmulo de N nos compartimentos da planta, também foram calculados: a eficiência de absorção de N (EAN) em mg N g⁻¹ MS de raiz, considerando a biomassa seca de raízes (SWIADER; CHYAN e FREIJI, 1994) (Equação 5) e também por Rosolem, Giommo & Laurenti (2000) que considera o comprimento do sistema radicular (Equação 6); a eficiência de transporte de N (ETN) em % (LI; McKEAND; ALLEN, 1991) (Equação 7); a eficiência de utilização de N (EUTN) em g MS g⁻¹ N (SIDDIQI; GLASS, 1981) (Equação 8); a eficiência fisiológica de N (EF) em kg MS kg N⁻¹ (Equação 9); e eficiência agrônômica de N (EA) em kg MS kg N⁻¹ (DOBERMANN, 2007) (Equação 10), por meio das seguintes expressões:

$$EAN - 1 \text{ (mg N g MS}^{-1}\text{)} = \frac{N\text{-total acumulado na planta (mg)}}{Biomassa seca da raiz (g)} \quad (\text{Equação 5})$$

$$EAN - 2 \text{ (mg N m raiz}^{-1}\text{)} = \frac{N\text{-total acumulado na planta (mg)}}{Comprimento das raízes (m)} \quad (\text{Equação 6})$$

$$ETN (\%) = \frac{N \text{ total acumulado na parte aérea (mg)}}{N \text{ total acumulado na planta toda (mg)}} \cdot 100 \quad (\text{Equação 7})$$

$$EUTN \text{ (g MS g N}^{-1}\text{)} = \frac{Biomassa seca da planta toda (g)}{N \text{ total acumulado na planta toda (g)}} \quad (\text{Equação 8})$$

$$EFN \text{ (kg MS kg N}^{-1}\text{)} = \frac{h - i}{j - k} \quad (\text{Equação 9})$$

Onde:

h = biomassa seca total (kg) da planta tratada com $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$;

i = biomassa seca total (kg) da planta controle (sem aplicação de $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$);

j = N total acumulado (kg) na planta tratada com $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$;

k = N total acumulado (kg) da planta controle (sem aplicação de $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$)

$$EAN \text{ (kg MS kg N}^{-1}\text{)} = \frac{l - m}{n} \quad (\text{Equação 10})$$

Onde:

l = biomassa seca total (kg) da planta tratada com $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$;

m = biomassa seca total (kg) da planta controle (sem aplicação de $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$);

n = Dose de N proveniente da $(^{15}\text{NH}_2)_2\text{CO}$ aplicada em superfície.

Resultados das avaliações realizadas pelo método indireto encontram-se nos ANEXOS C e D.

3.8 Determinação do poder tampão das substâncias húmicas

A capacidade de tamponamento de uma solução tampão é uma medida da capacidade da solução de resistir às variações de pH, após adição de um ácido ou base forte. Pertusatti & Prado (2007) descreveram a capacidade tamponante pela seguinte formula:

$$B = \left(\frac{dCb}{dpH} \right) = \left(- \frac{dCa}{dpH} \right)$$

onde Ca e Cb são as quantidades necessárias de ácido ou base para promover a mudança de uma unidade de pH, em um volume de solução. Na equação, quanto maior o valor de B , maior a resistência do composto a variação de pH (PERTUSATTI; PRADO, 2007).

Foi avaliado a capacidade tamponante das SH provenientes de leonardita (produto comercial KS 100[®]), por meio de titulações potenciométricas, utilizando-se um pH-metro. Em uma suspensão de 20 mg de SH em 50 mL de água deionizada, sob agitação magnética, as

amostras foram tituladas com ácido nítrico (HNO_3 0,05 mol L^{-1} , padronizado), e depois com hidróxido de sódio (NaOH 0,05 mol L^{-1} , padronizado). Para comparação com a variação do pH em água, também foi realizada uma titulação na ausência de SH. O procedimento foi realizado em triplicatas para cada extrator.

3.9 Determinação do pH das substâncias húmicas e dos fertilizantes estabilizados

Sabe-se que o consumo de prótons resultantes da hidrólise da UR e alcalinização gerada ao redor dos grânulos desfavorecem a formação de íons NH_4^+ , consequentemente, favorecendo a volatilização de NH_3 . Assim, qualquer fator presente no sistema solo-planta que tenha influência sobre o pH influenciará nas taxas de perdas (BYRNES, 2000). Dessa forma, buscando encontrar fatores que pudessem ter influenciado a elevação dos valores de pH do fertilizante, realizou-se ao término do experimento a leitura de pH das SH isoladamente e depois de todos os tratamentos já preparados. Para a determinação do pH das SH preparou-se uma suspensão da SH em solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} e também em água, na relação 1:5 (5g de SH dissolvidas em 25 mL de CaCl_2 ou água). Agitou-se cada solução e aguardou-se 30 minutos para leitura do pH em potenciômetro com eletrodo combinado. Para a medida do pH dos fertilizantes já preparados, preparou-se solução com 1g de fertilizante em 10 mL de água destilada (1:10). Posteriormente, procedeu-se a agitação da solução e leitura do pH. Ambos procedimentos foram realizados em triplicata e com base no manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais e corretivos (MAPA, 2013).

3.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa SAS (versão 9.3, SAS Institute, Inc., Cary, NC, EUA). Todos os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo procedimento PROC GLM do SAS. Quando encontrado efeito significativo entre tratamentos pelo teste F ($p \leq 0,05$), as médias das variáveis respostas foram comparadas pelo teste de LSD de Fischer ao nível de 5% de significância ou 20% de significância para médias da caracterização morfológica de raízes.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Perdas diárias e cumulativas de N por volatilização de NH_3 (% do N aplicado)

Os resultados de perdas diárias de NH_3 por volatilização fornecem valores em porcentagem de perdas de N na forma de NH_3 em cada dia de avaliação (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 11, e 15 dias após aplicação do fertilizante em superfície), em relação ao total de N aplicado em cobertura (180 mg kg^{-1}). Para o maior aproveitamento de N pela planta, o ideal seria que o máximo diário de perdas ocorresse o mais distante possível da data de aplicação do fertilizante, possibilitando maior tempo para absorção do N pela planta, incorporação pelas águas das chuvas ou irrigação, ou transformação do elemento em outra forma que não fosse volátil (ERNANI; SANGOI; RAMPAZZO, 2002).

As perdas diárias e cumulativas de N- NH_3 por volatilização após aplicação dos tratamentos em superfície estão indicadas nas Figuras 8A e 8B, respectivamente, e na forma de tabelas no ANEXO E. Durante os 15 dias de avaliação, notou-se que as maiores taxas de volatilização ocorreram nos primeiros oito dias após aplicação dos fertilizantes, com máximos entre o 4º e o 8º dia (Figura 8A), comportamento semelhante ao observado em outros trabalhos (SOARES et al., 2012; LEITE, 2016; SILVA, 2016). A ocorrência de maiores perdas nos primeiros dias após a aplicação do fertilizante pode ser explicada pela elevação do pH ao redor do grânulo no período inicial, resultante da hidrólise da UR e consumo de prótons durante essa reação (OVERREIN & MOE, 1967; RODRIGUES & KIEHL, 1992). A partir do 8º dia, a taxa de volatilização de N- NH_3 de todos os tratamentos reduziu-se significativamente, o que pode estar relacionado a redução das concentrações de N-amoniacal no solo, devido a volatilização inicial e queda do pH do solo associada ao consumo de OH^- , durante a volatilização e nitrificação do amônio (RECOUS; MARY; FAURIE, 1990; MARTIKAINEN, 1985). A estabilização das taxas de perdas de N- NH_3 ocorreu somente a partir do 11º dia após aplicação dos fertilizantes, tornando-se praticamente nulas, não havendo mais diferença entre os tratamentos.

Figura 8 - Perdas diárias (A) e cumulativas (B) de NH_3 por volatilização (% do N aplicado) após aplicação do fertilizante para todos os tratamentos.

As taxas diárias de perdas de NH_3 por volatilização das diferentes UR foram inferiores a 12% do total do N aplicado (Figura 8A), valor relativamente mais baixo se comparado com alguns experimentos de campo, como 20% relatados por Faria (2013) e 24% em Silva (2016); mas também relativamente próximos aqueles encontrados em condições de laboratório, como 10% descritos por Soares et al. (2012). Já as perdas de N- NH_3 acumuladas no período de 15 dias alcançaram até 43% do total de N aplicado (Figura 8B), valor relativamente superior em relação aos relatados por Soares et al. (2012) e Rech et al. (2017), porém semelhantes aos encontrados por Silva (2016) em condições de campo com a cultura do milho. As diferenças nos valores encontrados ocorreram não somente devido as diferentes tecnologias empregadas no tratamento da UR, mas, principalmente, por fatores ambientais e da eficiência de captura do coletor de volatilização, que podem variar sensivelmente de um experimento para outro. Pelo exposto pode-se enfatizar que, comparações quantitativas de volatilização de NH_3 entre tratamentos devem ser feitas apenas dentro do mesmo experimento, podendo-se somente comparar diferentes experimentos sob o aspecto qualitativo, ou seja, em relação a diferentes fontes nitrogenadas.

Apesar de o experimento ter sido conduzido em casa de vegetação, sem restos de cultura em superfície capazes de potencializar as perdas de N- NH_3 por volatilização, os altos valores de perdas acumuladas obtidos podem ser explicados pelo método de irrigação adotado no experimento. A partir do dia em que os tratamentos foram aplicados em superfície e durante 15 dias até o final da avaliação da volatilização, a terra foi irrigada somente do lado oposto ao da aplicação do fertilizante, evitando-se o contato dos fertilizantes-N com a água e, consequentemente, sua incorporação no solo. A percolação do fertilizante no solo permitiria que a amônia resultante da hidrólise da UR encontrasse valores de pH mais baixos no solo, convertendo novamente ao íon NH_4^+ . Consequentemente, caso o procedimento na irrigação fosse outro, haveria redução nas perdas de N- NH_3 por volatilização, o que não evidenciaria o efeito dos inibidores de urease usados como material de revestimento do fertilizante. A aplicação de água somente do lado oposto ao fertilizante pode ter intensificado a taxa de evaporação de água no lado onde a UR foi aplicada, o que fez com que a NH_3 formada fosse arrastada pela água de evaporação do solo e capturada no coletor.

As maiores taxas de volatilização diárias de N- NH_3 foram dos tratamentos sem inibidor de urease, fazendo parte desse grupo a UR convencional (UR sem inibidor de urease e sem adição de SH) e UR sem inibidor de urease recoberta com 0,6 ou 1,2% de SH, no período de 4 a 8 dias após aplicação dos fertilizantes (Figura 9A). É possível observar um acréscimo expressivo nas perdas já do 1º para o 2º dia de avaliação, enquanto que os grupos

com inibidores de urease apresentaram aumentos mais bruscos nas perdas diárias somente do 3º para o 4º dia (Figura 9B e 9C) ou do 4º para o 5º dia após a aplicação dos fertilizantes (Figura 9D), demonstrando o efeito dos inibidores no atraso do máximo de volatilização. Os máximos de perdas para o grupo sem inibidor de urease foram observados no 4º dia após aplicação do fertilizante com perdas de 11,5% para o tratamento 1,2% SH, e 10,8% para somente ureia e 0,6% SH (Figura 9A). Apesar dos máximos de taxas de perdas terem ocorrido no mesmo dia, os tratamentos com adição de SH mostraram incremento expressivo logo do 1º para o 2º dia, enquanto que a UR convencional apresentou esse comportamento um dia mais tarde, do 2º para o 3º dia após sua aplicação.

Esse aumento na taxa de hidrólise da UR nos tratamentos sem inibidor de urease e com adição de SH pode também ser observado na Figura 10A, onde se nota que no período 0 a 3 dias as perdas das URs com SH mostraram-se superiores às da UR convencional; enquanto que no período seguinte, de 4 a 8 dias, o desempenho das perdas desse grupo mostrou-se o inverso. Esses resultados demonstram que as perdas de NH_3 da UR convencional (sem inibidor de urease e sem SH) ocorreram mais tardiamente em comparação aqueles com adição de SH.

Figura 9 - Perdas diárias de N-NH_3 (% do N aplicado) após aplicação dos fertilizantes por categoria de inibidor de urease, sendo A (sem inibidor de urease); B (0,40% B + 0,15% Cu); C (0,64% B); e D (NBPT) associados ou não com SH.

Figura 10 – Perdas diárias de NH₃ por volatilização (% do N aplicado) nos períodos de 0 a 3 (A), 4 a 8 (B) e 9 a 15 (C) dias após a aplicação do fertilizante. Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre inibidores de urease (0,40%B + 0,15%Cu; 0,64% B; e NBPT) e sem inibidor, e letras minúsculas representam a diferença estatística entre os tratamentos com concentrações de SH (0,0; 0,6; 1,2%) obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.

Avaliando-se as perdas cumulativas ao longo dos 15 dias de avaliação, nota-se que, independentemente da adição ou não de SH no revestimento da UR, o grupo de tratamentos sem inibidor de urease revelou as maiores perdas cumulativas de NH_3 (Figuras 8B e 11C). Nesse grupo, a UR com maior concentração de SH (1,2% SH) mostrou-se o menos eficiente, com perdas de 42,6% do N aplicado, enquanto que os demais: 0,6% SH e UR convencional apresentaram perdas de 40% e 38,8% do N aplicado, respectivamente, sem diferenças estatísticas entre si (Figura 11C). Ainda em relação as perdas cumulativas, nota-se que, no dia três, a adição de SH (0,6% e 1,2% SH) proporcionou maiores perdas em relação a UR convencional (Figura 11A). Cinco dias mais tarde, aos 8 dias, as perdas de UR convencional e 0,6% SH se igualaram, enquanto que o tratamento com maior concentração de SH (1,2% SH) já se mostrava superior na promoção de perdas de NH_3 , comportamento esse que se manteve até o dia 15 (Figuras 11B).

O tratamento com 0,64% B demonstrou ser mais eficiente que os tratamentos sem inibidor e com 0,40% B + 0,15% Cu na redução das perdas de NH_3 por volatilização, igualando-se a 0,40% B + 0,15% Cu em perdas cumulativas somente com a adição de 1,2% SH, e aos 15 dias após a aplicação do fertilizante (Figura 11C). Analisando primeiro as perdas diárias de NH_3 para o grupo com 0,64% B na Figura 10, verifica-se diferenças entre tratamentos desse grupo já no período de 0 a 3 dias (Figura 10A), em que o tratamento com 0,64% B + 0,6% SH mostrou ser menos eficiente na mitigação de perdas por volatilização (perdas de 0,79%) em comparação a 0,64% B + 1,2% SH (perdas de 0,6%) (Figura 10A). Ambos tratamentos com adição de SH não se diferiram do tratamento sem SH (0,64% B), evidenciando que, para esse período de 0 a 3 dias, a adição ou não de SH nas concentrações avaliadas não tem impacto sob as perdas de NH_3 por volatilização da UR. No período seguinte, 4 a 8 dias, observou-se as maiores taxas de perdas, com destaque para os tratamentos com adição de SH. Diferentemente do período anterior, a adição de SH parece ter favorecido ou acelerado a taxa de hidrólise da UR promovendo maiores perdas de NH_3 por volatilização, independentemente da concentração de SH aplicada (Figura 10B).

Figura 11 - Perdas cumulativas de NH₃ por volatilização (% do N aplicado) aos 3 (A), 8 (B), e 15 (C) dias após a aplicação do fertilizante. Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre inibidores de urease (0,40%B + 0,15%Cu; 0,64% B; e NBPT) e sem inibidor, e letras minúsculas representam a diferença estatística entre os tratamentos com concentrações de SH (0,0; 0,6; 1,2%) obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.

Do comportamento das perdas diárias de NH_3 para o tratamento 0,64% B + 0,6% SH que constam da Figura 9C, notou-se que, além de apresentar o maior valor de máximo de perdas, esse máximo também ocorreu mais cedo, no 5º dia, enquanto que para os outros dois tratamentos, sem SH e com 1,2% SH, as maiores taxas de perdas ocorreram no 6º dia após a aplicação do fertilizante. Por fim, verificou-se que no último período avaliado, 9 a 15 dias, as perdas do tratamento sem adição de SH (0,64% B) mostrou-se superior aquelas com SH (Figura 10C). No entanto, isso pode ser explicado pelas menores perdas no período anterior, 4 a 8 dias, fazendo com que aquelas do período seguinte fossem maiores. Os tratamentos com SH, por terem apresentado uma taxa de hidrólise enzimática mais expressiva no período de 4 a 8 dias, acabaram tendo uma queda mais brusca nas perdas diárias de NH_3 no período seguinte (9 a 15 dias), e por isso mostraram-se inferiores a 0,64% B.

No que se refere as perdas cumulativas de NH_3 , o mesmo comportamento observado nas taxas diárias no período de 0 a 3 dias, foi encontrado para perdas cumulativas até o dia 3, no qual o tratamento com a concentração intermediária de SH (0,64% B + 0,6% SH) mostrou-se superior ao 0,64% B + 1,2% SH, porém semelhante a 0,64% B sem recobrimento com SH (Figura 11A). Oito dias após a aplicação do fertilizante, a adição de 0,6% e 1,2% de SH em associação com o inibidor 0,64% B pode ter sido o fator responsável pelas maiores perdas cumulativas de NH_3 da UR, sem distinções quanto a dose de SH aplicada (Figura 11B). Para o último período avaliado, 15 dias após a aplicação dos fertilizantes, não se verificou diferenças entre os tratamentos, sem e com SH (Figura 11C).

Em resumo, a concentração mais elevada de B (0,64% B) mostrou-se mais eficiente que a associação B + Cu (0,40%B + 0,15%Cu), tanto em termos de máximos diários de perdas de NH_3 quanto em perdas cumulativas obtidas ao final de 15 dias de avaliação. O tratamento 0,40% B + 0,15% Cu registrou perdas de 8,9% do N aplicado no 6º após aplicação do fertilizante, enquanto o tratamento 0,64% B apresentou máximo diário de perda de 5% no 5º dia após sua aplicação (Figuras 9B e 9C). Em relação às perdas cumulativas, foram quantificadas perdas de 33,23% para 0,40% B + 0,15% Cu e 27,78% para 0,64% B, sendo esses resultados diferentes estatisticamente (Figura 11C).

Apesar de o ácido bórico ser classificado como ácido fraco, sendo pouco ionizado em solução aquosa, (SOARES, ALLEONI; CASAGRANDE, 2005), é possível que a aplicação de uma concentração mais elevada (0,64% B) tenha promovido maior liberação de H^+ que o tratamento com 0,40%B + 0,15%Cu, que teria sido suficiente para protonar maior quantidade de NH_3 produzido ao redor dos grânulos de UR. A maior concentração de H_3BO_3 pode

também ter causado maior inibição competitiva do elemento sobre a atividade da enzima urease, o que seria uma explicação mais plausível.

Os resultados obtidos neste estudo se assemelham com os obtidos por Cheng (2018) (resultados não apresentados e não publicados: informação pessoal) em experimento previamente conduzido em laboratório, no LIE-CENA/USP, em que foi constatado que o aumento das doses de B resultou em menores perdas de NH_3 em comparação à dose de uso comercial: 0,40%B + 0,15%Cu. Além disso, os resultados do ensaio de Cheng (2018) mostraram que o uso isolado de sulfato de cobre no recobrimento da UR, nas doses de 0,05 e 0,10% e 0,15% de Cu, não se mostrou eficiente na redução das perdas de NH_3 por volatilização em comparação a UR convencional. Enquanto isso, nos tratamentos em que foram empregadas doses isoladas de ácido bórico, observou-se reduções significativas nas perdas de NH_3 em comparação à UR não tratada. Com efeito, os resultados obtidos neste experimento com o apoio dos de Cheng (2018) podem sugerir que o cobre, como material de revestimento da UR, não tem participação tão significativa na inibição da enzima urease quanto o ácido bórico. Caso comprovado esses resultados em outros experimentos, o uso de recobrimento de UR somente com ácido bórico certamente proporcionará menor custo de produção para a indústria, considerando-se o custo do sulfato de cobre no produto final.

Analisando-se a última categoria de inibidores de urease, o NBPT, e sua associação com SH, pode-se afirmar categoricamente que foi o grupo de tratamentos mais efetivo na mitigação das perdas por volatilização de NH_3 , estando associados ou não com SH. A afirmação pode ser comprovada observando os resultados da Figura 9D comparativamente às Figuras 9A, 9B e 9C, em que se constatou os menores e mais tardios valores máximos de perdas diárias de NH_3 . Dentro desse grupo, o fator de maior destaque foi que, independentemente da concentração de SH aplicada, seja 0,6% ou 1,2% de SH, a adição desse composto potencializou as perdas por volatilização de NH_3 . Nos três períodos analisados em perdas diárias de NH_3 , 0 a 3 dias, 4 a 8 dias, e 9 a 15 dias, observa-se acréscimo nas perdas de NH_3 por volatilização com a adição de SH, sendo a diferença entre a adição ou ausência ainda mais significativa no período de 4 a 8 dias (Figuras 10A, 10B e 10C). Também se notou que em nenhum período houve diferença no que tange as doses de SH aplicadas como revestimento do fertilizante. Ao analisar o comportamento da curva de perdas diárias de NH_3 ao longo dos 15 dias de avaliação na Figura 9D, verifica-se comportamento similar entre os tratamentos somente até o 3º dia após a aplicação do fertilizante. Logo após, do 4º ao 15º dia de avaliação, a adição de SH já afetou negativamente a disponibilidade de N para as plantas, intensificando as perdas por volatilização de NH_3 . O impacto negativo do uso das SH também

pode ser visto nos máximos diários de perdas, onde na ausência de SH o máximo ocorreu no 8º dia após aplicação do fertilizante, enquanto que na presença (0,6% SH e 1,2% SH) o pico de máximo de perdas se deu 2 dias antes, no 6º dia após aplicação dos tratamentos. Em relação às perdas cumulativas de NH_3 , o comportamento foi o mesmo que aquele encontrado nas perdas diárias. Em outras palavras, a adição de SH nas doses de 0,6% e 1,2% aumentou as perdas de NH_3 nos dias três, seis, e 15 (Figuras 11A, 17B e 17C). A maior eficiência do NBPT na mitigação das perdas por volatilização de NH_3 pode ser atribuída ao seu modo de ação, bloqueando fortemente os três sítios ativos da molécula da urease (MANUNZA et al., 1999), enquanto que o ácido bórico e o cobre inibem apenas um sítio ativo (SHAW, 1954; BENINI et al., 2004).

De uma maneira geral, acredita-se que as SH aplicadas como material de revestimento da UR podem ter sido um dos responsáveis pela intensificação das perdas de NH_3 por volatilização, esteja a UR recoberta ou não com inibidores de urease. A afirmação é feita considerando que o experimento foi conduzido sob condições controladas de casa de vegetação, mantendo-se a umidade dos vasos sempre a 50% da capacidade máxima de retenção de água. Com base em estudos e resultados prévios encontrados na literatura, acreditava-se que a aplicação de SH no tratamento da UR poderia auxiliar no maior aproveitamento de N pelas plantas por meio da redução das perdas de N por volatilização de NH_3 . Comparações com trabalhos semelhantes, porém conduzidos em condições diferentes, foram feitas em virtude da escassez de pesquisas com o mesmo método de tratamento e aplicação dos fertilizantes. Alkanani et al. (1990), por exemplo, verificaram que a aplicação de SH de leonardita, mesma fonte de extração utilizada neste trabalho, juntamente com solução de UR e nitrato de amônio, reduziu significativamente a taxa de hidrólise da UR em dois solos incubados em condições de laboratório. Os autores atribuíram a mitigação das perdas de NH_3 ao efeito inibitório das SH sobre a enzima urease, onde a enzima seria capturada e armazenada na estrutura do composto orgânico perdendo seu efeito (PETTIT et al., 1976). Portanto, embora as condições tenham sido ligeiramente distintas, os resultados obtidos por Alkanani et al. (1990) são opostos aos encontrados neste trabalho.

Em outro experimento também conduzido com solos incubados, Kasim et al. (2009) notaram que a aplicação de solução de AH e AF (previamente acidificados) juntamente com a UR reduziram a volatilização de NH_3 proveniente do fertilizante em 29,2% e 11,4%, respectivamente. Já a aplicação conjunta, AH e AF (também previamente acidificados) proporcionou redução de apenas 8% em comparação a UR sólida convencional. Quando não acidificados, a redução decresceu para 4%. A explicação para redução das perdas, segundo os

autores, seria a alta CTC ($417\text{--}583\text{ cmol}_c\text{ dm}^{-3}$) do AH, gerada na ionização dos grupos carboxílicos (COOH) e fenólicos (OH) que conservariam o N na forma de NH_4^+ evitando sua transformação para NH_3 . Novamente, apesar de conduzidos em condições ambientais diferentes e alguns tratamentos terem sido previamente acidificados, nota-se grande discrepância entre os resultados obtidos por Kasim et al. (2009) com os encontrados no presente estudo.

Os resultados aqui obtidos também contradizem àqueles encontrados por Leite (2016). O autor avaliou a volatilização de NH_3 proveniente da aplicação de UR convencional e UR solubilizada em SH extraída de turfa, com e sem correção de pH, na presença e ausência de NBPT. O experimento de Leite (2016) foi conduzido em condições de laboratório, aplicando-se o fertilizante sobre a superfície do solo coberto com palha de cana-de-açúcar. Ao fim de 21 dias de avaliação, o autor observou que o tratamento UR + SH sem correção de pH reduziu o máximo de volatilização, em torno de 2,4% em comparação a UR convencional. Com relação as perdas cumulativas de NH_3 , obtidas ao final do período, o fertilizante convencional registrou perdas próximas de 65% do N aplicado, enquanto o tratamento UR + SH sem correção de pH apresentou perdas em torno de 45%, uma redução de aproximadamente 20%.

Em princípio, nota-se grande divergência em relação aos resultados apresentados com os do presente trabalho, já que os máximos de perdas dos tratamentos UR + 0,6% e UR + 1,2% SH praticamente não foram diferentes da UR convencional (Figura 9A). O mesmo se aplica para as perdas cumulativas verificadas ao fim dos 15 dias de avaliação deste experimento, em que se registrou perdas de 38,8% para UR convencional, 40% para UR + 0,6% SH, e 42,6% para UR + 1,2% SH (Figura 11C). No entanto, comparações entre resultados deste estudo e o de Leite (2016) não devem ser realizadas devido às diferentes fontes e formas de extração das SH e também do método de aplicação. Assim como o próprio autor detalhou em seu estudo, “a perda de NH_3 da solução UR + SH sem a correção de pH foi menor que a UR fertilizante pelo fato de o N estar em solução com SH, favorecendo a permeabilidade da solução na palhada”, enquanto no presente estudo as SHs foram aplicadas na forma de pó recobrindo a UR granulada. Leite (2016) ainda afirmou que a capacidade das SH de aprisionar o N em suas estruturas químicas ocorre pelo poder tampão dessas substâncias ou mesmo inibir a atividade da enzima urease, o que seria outra explicação plausível, pelas menores perdas em comparação à UR convencional.

4.1.1 pH das substâncias húmicas e dos fertilizantes estabilizados

A potencialização das perdas de NH_3 por volatilização neste estudo pode ser explicada pelos valores de pH das SH utilizadas no tratamento da UR e a capacidade tamponante das SH. A leitura do pH dos fertilizantes estabilizados associados ou não com SH pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2 - pH dos fertilizantes-N solubilizados em água destilada na razão 1:10.

Inibidores de urease	SH	pH
	(%)	(1:1 H_2O)
0,40% B + 0,15% Cu (22,9 g kg^{-1} H_3BO_3 + 1,5 g kg^{-1} Cu)	0,0	5,8
	0,6	5,8
	1,2	5,9
0,64% B (36,6 g kg^{-1} H_3BO_3)	0,0	6,0
	0,6	6,4
	1,2	6,9
NBPT (530 mg kg^{-1})	0,0	7,0
	0,6	7,6
	1,2	8,1
Sem inibidor	0,0	7,1
	0,6	7,7
	1,2	8,3

Antes de se atentar aos valores encontrados, deve-se mencionar o elevado valor de pH encontrado para SH, 9,6 e 9,3 em CaCl_2 0,01 mol L^{-1} e em água, respectivamente, os quais podem ter relação direta com os altos valores de pH registrados para os fertilizantes estabilizados com SH. Nota-se, principalmente nos grupos 0,64% B, NBPT e sem inibidor de urease, o aumento do pH após adição de SH, que se intensificou com a elevação da concentração do composto orgânico de 0% SH para 1,2% SH. Exceção se aplica para o tratamento 0,40% B + 0,15% Cu + 0,6% SH, em que se registrou apenas um leve aumento após adição de 1,2% SH.

Leite (2016) comparou as perdas de NH_3 a partir de UR solubilizada em SH com correção de pH (pH = 7) e sem correção (pH = 9). As SH foram extraídas de turfa com solução de KOH 0,2 mol L^{-1} em proporção de 1:5 de sólido-líquido por agitação mecânica por 6h e o sobrenadante, separado, foi acidificado a pH 6,5 com 2 M de H_3PO_4 . O autor verificou

que o tratamento com a correção do pH da solução resultou em maior redução na volatilização de NH_3 comparado aos tratamentos em que não houve o ajuste do pH. Quando o pH do tratamento UR solubilizada em SH foi ajustado para 7, as perdas cumulativas de NH_3 ao fim de 21 dias ficaram em torno de 35%. Por outro lado, quando não houve ajuste do pH ($\text{pH} = 9$) as perdas de N por volatilização de NH_3 foram 10% superiores, com valores em torno de 45%. Para fins de comparação, a aplicação de UR convencional registrou perdas próximas de 65% do N aplicado. Apesar dos resultados encontrados por Leite (2016), sabe-se que os tratamentos foram solubilizados e as SH utilizadas foram extraídas de turfa, com propriedades e constituição química diferentes das extraídas de leonardita.

Reeza et al. (2009) observaram que a aplicação de AH e AF derivados de carvão juntamente com a UR reduziu as perdas de N por volatilização de NH_3 de 13 a 25% comparado a UR convencional. Segundo os autores, a redução teria ocorrido devido ao baixo pH dos AH (1,90-2,27) e AF (1,14-1,20) adicionados a UR (bem diferente dos valores encontrados neste experimento), que teriam causado a redução temporária do pH do meio, atrasando a hidrólise da UR. Os autores também atribuíram a mitigação das perdas a elevada acidez total dos AH e AF utilizados ($850 - 970 \text{ cmol kg}^{-1}$). A medida que a UR se hidrolisa, libera grandes quantidades de NH_4^+ e HCO_3^- na solução do solo. Os íons NH_4^+ são então adsorvidos aos sítios de cargas negativas dos grupos carboxílicos e fenólicos dos AH e AF reduzindo a transformação para NH_3 . Note-se, novamente, a grande importância da caracterização química completa do composto antes de sua aplicação e dos diferentes efeitos proporcionados dependendo da fonte de extração.

4.1.2 Poder tampão das substâncias húmicas de leonardita

Diversos estudos defendem a capacidade das SH em reduzir a hidrólise da UR devido ao tamponamento biológico das SH em populações microbianas e atividades enzimáticas (DONG et al., 2009). O efeito tamponante poderia reduzir a perda de N- NH_3 proveniente da UR, aumentando a retenção de N na forma de NH_4^+ (KASIM et al., 2009). Avaliou-se então a capacidade das SH desse experimento em solução em resistir a variações de pH após titulações potenciométricas com ácido (Figura 12A) ou base forte (Figura 12B), comparando-a com as variações em água destilada.

Figura 12 – Capacidade tampão da SH de leonardita em função do pH após titulação (mL) com HNO₃⁻ (0,05 mol L⁻¹) e NaOH (0,05 mol L⁻¹). A: leitura do pH após adição de ácido; B: leitura após adição de base.

Os resultados da Figura 12 evidenciaram para as SH utilizadas no presente estudo demonstraram poder de tamponamento na acidificação do meio após adições de HNO₃ 0,05 mol L⁻¹. Entretanto, nenhuma resistência foi observada nas variações do pH das SH após a basificação com NaOH 0,05 mol L⁻¹, apresentando o mesmo comportamento que a curva em água destilada. Considerando que o processo de hidrólise enzimática da UR no solo implica na elevação do pH ao redor do grânulo devido ao consumo de prótons (H⁺), sendo que parte do amônio é convertido em amônia, o poder tamponante das SH de leonardita não se mostrou eficiente em reduzir ou atrasar essa reação com base nas perdas de NH₃ quantificadas e poder tampão em meio alcalino (Figura 12B).

Analisando-se as características químicas da composição das SH de leonardita utilizadas nesse experimento [70% AH (m/m); 8% AF] nota-se o amplo predomínio dos AH em relação aos AF, o que pode ajudar a explicar o fraco desempenho de poder tampão em meio alcalino. Segundo Canellas et al. (2001) e Pettit (2004), os AF possuem teor de oxigênio duas vezes maior que os AH por possuírem elevado número de grupamentos funcionais oxigenados (grupos carboxílicos e fenólicos). Por essa razão, a capacidade de troca de cátions dos AF é mais do que o dobro dos AH, o que lhe conferem também maior reatividade e maior capacidade tamponante em comparação as demais frações das SH. Portanto, é possível que, caso os AF tivessem maior participação na constituição das SH utilizadas, talvez proporcionassem maior resistência ao aumento do pH decorrente do processo de hidrólise enzimática da UR e, conseqüentemente, menores perdas de NH₃ por volatilização.

Dong et al. (2009) afirmaram que AH de lignito (rocha sedimentar formada pela compressão da turfa) podem apresentar tamponamento biológico em populações microbianas e inibir a atividade da urease, reduzindo assim a taxa de hidrólise da UR e perdas de NH_3 por volatilização. No entanto, os autores ressaltaram que os AH podem apresentar variações nas suas características químicas e propriedades dependendo da sua origem. Essa afirmação pode ajudar a explicar a baixa resistência a variação de pH das SH de leonardita após adição de base, mesmo tendo em sua constituição 70% de AH. Outro estudo conduzido por Pertusatti e Prado (2007) sugere que AH de Fluka (marca registrada da indústria química Sigma-Aldrich - AH de origem comercial sem informações sobre origem ou método de extração) possuem alta resistência após adição de base forte, aparentemente opondo-se aos resultados encontrados neste trabalho. Contudo, os mesmos autores ainda afirmaram que a resistência a variação do pH ocorreu na faixa de 5,5 e 8, e o pH inicial encontrado para SH de leonardita nesse experimento foi de 9,4 (Figuras 12A e 12B). Esse elevado valor de pH pode ser explicado pela alta concentração de AH no produto, os quais são menos ácidos que os AF por possuírem mais grupos aromáticos e menos grupos carboxílicos e C-O alquil em sua constituição.

4.2 Avaliações de crescimento, valor SPAD e biomassa seca das plantas de milho

No estágio V8 das plantas de milho, a análise de variância revelou que não houve efeito entre tratamentos para altura e diâmetro de colmo, somente havendo diferença para valores SPAD entre a média dos tratamentos adubados e o controle (Tabela 3). De forma semelhante ao SPAD, houve diferença em área foliar entre a média dos tratamentos adubados e o controle. Todas essas avaliações no V8 não indicaram diferenças entre os inibidores de urease e concentrações de SH.

Dez dias após o V8, no estágio VT, foram observadas diferenças na altura de plantas e diâmetro de colmo somente entre a média dos tratamentos adubados e a média do controle (Tabela 3). Para o índice SPAD, houve mais uma vez efeito de controle, ou seja, a média do controle diferiu-se da média do grupo formado pelos demais tratamentos. Também houve efeito de inibidor, em que o tratamento 0,64% B obteve índice SPAD superior ao tratamento sem inibidor. Os demais tratamentos, NBPT e 0,40%B + 0,15%Cu, não diferiram estatisticamente dos demais. Para a área foliar, assim como em V8, não foram observadas diferenças entre inibidores de urease ou concentração de SH. Somente a média dos tratamentos adubados foi superior ao controle.

Poucas diferenças foram encontradas na avaliação dos atributos morfológicos das plantas de milho em resposta aos tratamentos aplicados deste estudo. O que se notou, apenas, foi o aumento no crescimento ao longo do tempo, com exceção para o índice SPAD, cujos valores reduziram dos 52 para os 62 DAS, devido à redução no teor de N foliar (KOLLN, 2012) causado pelo efeito de diluição do nutriente em relação ao aumento da biomassa. Resultados semelhantes no índice SPAD foram encontrados por Vieira-Megda (2013) e Moreira (2016) com cana-de-açúcar, em que o índice foi influenciado positivamente pela adubação nitrogenada; no entanto, não foi capaz de diagnosticar diferenças entre fontes de N.

Em estudo com plantas de milho, Argenta et al. (2001) relataram falta de relação entre leitura com clorofilômetro e teor de N na folha e de associação entre teor de N e clorofila extraível na folha no estágio de seis a sete folhas. Isso pode indicar que parte do N absorvido nessa fase (V6 e V7) é, provavelmente, utilizado para produção de outras estruturas na planta e não para formação de clorofila. Portanto, as leituras efetuadas com medidor portátil de clorofila, com objetivo de verificar nível de N na planta, não são muito precisas nos estádios iniciais de desenvolvimento do milho, o que talvez explique a ausência de diferenças entre os tratamentos adubados no estágio V8, neste estudo.

Tabela 3. Efeito dos inibidores de urease e substâncias húmicas na altura (cm), diâmetro de colmo (mm), área foliar (cm²) e valor SPAD de plantas de milho nos estádios V8 e VT, respectivamente, aos 52 e 62 dias após a semeadura.

Inibidor de urease	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média
	0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2	
1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)																
	Altura (cm)				Ø de colmo (mm)				Valor SPAD				Área foliar (cm²)			
0,40%B + 0,15% Cu	96,0	97,7	91,7	95,1	22,2	21,7	21,3	21,7	56,4	55,2	56,3	56,0	6995	7199	6899	7031
0,64% B	103,7	104,0	99,7	102,4	21,1	20,9	21,1	21,0	55,5	57,0	55,9	56,1	6739	7049	6987	6925
Ausente	88,7	101,3	100,7	96,9	21,6	21,7	21,2	21,5	54,6	54,8	53,3	54,2	7139	7542	7331	7337
NBPT	98,7	90,7	96,0	95,1	22,1	20,8	21,3	21,4	58,8	55,0	55,0	56,3	7180	7282	6776	7079
Média	96,7	98,4	97,0	97,4	21,8	21,3	21,2	21,4	56,3	55,5	55,1	55,6*	7013	7268	6998	7093*
Controle	-	-	-	91,0	-	-	-	20,8	-	-	-	44,9	-	-	-	6275
P Inibidor	0,06				0,52				0,19				0,36			
P SH	0,78				0,34				0,43				0,34			
P Inibidor x SH	0,09				0,90				0,46				0,94			
P Trat x Controle				0,10				0,31				<0,05				<0,05
2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)																
	Altura (cm)				Ø de colmo (mm)				Valor SPAD				Área foliar (cm²)			
0,40%B + 0,15% Cu	138,3	135,3	141,3	138,3	21,4	21,5	22,4	21,8	37,0	39,0	40,2	38,7 ab	8029	8042	8274	8115
0,64% B	133,0	138,3	133,0	134,8	22,6	21,1	22,2	22,0	44,1	40,0	39,0	41,0 a	8068	7889	8276	8078
Ausente	139,0	137,3	129,0	135,1	20,7	21,6	21,9	21,4	35,6	33,0	37,7	35,5 b	7930	8208	8126	8088
NBPT	133,0	141,3	142,7	139,0	22,1	22,3	20,9	21,8	39,5	41,4	38,1	39,7 ab	7929	8081	7902	7971
Média	135,8	138,1	136,5	136,8*	21,7	21,6	21,8	21,7*	39,1	38,3	38,7	38,7*	7989	8055	8145	8063*
Controle	-	-	-	122,7	-	-	-	20,8	-	-	-	26,0	-	-	-	6192
P Inibidor	0,73				0,86				<0,05				0,90			
P SH	0,85				0,92				0,87				0,69			
P Inibidor x SH	0,62				0,49				0,20				0,93			
P Trat x Controle				<0,05				<0,05				<0,05				<0,05

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease na vertical obtida pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%. A diferença entre a média dos tratamentos e a média do controle foi identificada por *.

Com relação a biomassa seca de raízes (MS Raiz), parte aérea (MS PA) e total (MS Total) houve somente efeito em relação ao controle, ou seja, a média do controle diferiu-se apenas da média do grupo formado pelos demais tratamentos (Tabela 4). Com efeito, não houve diferença entre os inibidores de urease ou das concentrações de SH na produção de biomassa seca de plantas de milho em V8 e VT. Resultados semelhantes foram observados por Leite (2016) em dois estudos conduzidos com cana-de-açúcar em casa de vegetação, em que não foram encontradas diferenças em biomassa seca de parte aérea 30 dias após aplicação de UR + SH via foliar. Embora tenha aumentado ao longo do tempo, a biomassa das plantas não foi afetada pela aplicação do fertilizante.

Hartz & Bottoms (2010) também não obtiveram respostas na absorção de nutrientes e biomassa seca de alface e tomate após aplicação de cinco produtos comerciais de SH de leonardita via líquida ou sólida, em casa de vegetação e em campo. Os autores afirmaram que os principais estudos sobre os efeitos fisiológicos nas plantas causados pelas SH são conduzidos em meio hidropônico ou com substratos de areia, enquanto que respostas positivas em campo ocorrem provavelmente devido ao baixo teor de MOS. Apesar de, em geral, estudos indicarem aumentos de 15-25% de biomassa de parte aérea e raízes, aproximadamente metade das respostas de biomassa de parte aérea e um terço em raízes não encontraram aumentos maiores que 5% em crescimento de planta (ROSE et al., 2014). Esses resultados demonstram a alta variação e a incerteza dos efeitos.

Embora neste estudo não tenha trabalhado com doses de N, há trabalhos em condições brasileiras em que a adubação nitrogenada do milho promoveu pequeno aumento de produtividade de grãos (GOMES et al., 2007; SORATTO et al., 2010; GOES et al., 2013) ou até mesmo não obteve efeito em relação ao controle (SOUZA et al., 2003; LANGE; LARA CABEZAS; TRIVELIN, 2009; GOES et al., 2012; SCHONINGER, 2014).

González Villalba (2014), por exemplo, trabalhando com misturas de UR revestida com polímeros e UR convencional aplicados na semeadura do milho constatou que a produtividade do controle ($10.100 \text{ kg ha}^{-1}$) foi semelhante a produtividade obtida quando aplicados 180 kg ha^{-1} de N na forma de UR recoberta com polímeros ($10.750 \text{ kg ha}^{-1}$) ou UR convencional (9.840 kg ha^{-1} de N). O autor sugeriu que o solo apresentava alto potencial de mineralização de N, sendo, portanto, um bom fornecedor de N à cultura. Considerando que o potencial de mineralização de N está relacionado com a oxidação da MOS, é possível que o revolvimento da terra no momento da homogeneização dos fertilizantes e calcário com a betoneira possa ter contribuído para aumentar a disponibilidade de N às plantas.

Tabela 4. Biomassa seca (g planta⁻¹) de raízes (MS Raiz), parte aérea (MS PA) e total (MS total) de plantas de milho nos estádios V8 e VT, respectivamente, aos 52 e 62 dias após a semeadura.

Inibidor de urease	SH (%)				Média	SH (%)				Média	SH (%)				Média
	0	0,6	1,2			0	0,6	1,2			0	0,6	1,2		
1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)															
	MS Raiz (g)					MS PA (g)					MS Total (g)				
0,40%B + 0,15% Cu	15,4	13,3	14,5	14,4		80,1	77,7	76,5	78,1		95,5	91,1	91,0	92,5	
0,64% B	15,7	15,8	13,5	15,0		73,4	77,2	73,3	74,6		89,1	93,0	86,7	89,6	
Ausente	16,3	16,0	16,9	16,4		80,6	78,6	83,5	80,9		96,9	94,6	100,5	97,3	
NBPT	16,7	17,0	15,7	16,5		84,2	78,2	79,4	80,6		100,8	95,1	95,2	97,0	
Média	16,0	15,5	15,2	15,6*		79,6	77,9	78,2	78,6*		95,6	93,5	93,3	94,1*	
Controle	-	-	-	11,0		-	-	-	65,0		-	-	-	76,0	
P Inibidor	0,38					0,36					0,34				
P SH	0,79					0,87					0,84				
P Inibidor x SH	0,93					0,92					0,94				
P Trat x Controle	<0,05					<0,05					<0,05				
2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)															
	MS Raiz (g)					MS PA (g)					MS Total (g)				
0,40%B + 0,15% Cu	28,4	25,2	26,4	26,7		119,5	119,5	123,6	120,9		147,9	144,8	150,0	147,6 a	
0,64% B	24,8	25,0	22,2	24,0		114,4	103,2	114,3	110,6		139,2	128,2	136,5	134,6 b	
Ausente	26,4	28,6	27,20	27,5		121,0	119,8	118,7	119,8		147,3	148,3	145,9	147,2 a	
NBPT	23,1	25,3	23,7	24,0		112,9	124,0	115,5	117,5		136,0	149,2	139,1	141,4 ab	
Média	25,6	26,0	24,1	25,4*		117,0	116,6	118,0	117,2*		142,6	142,6	142,9	142,7*	
Controle	-	-	-	18,1		-	-	-	96,9		-	-	-	115,0	
P Inibidor	0,23					0,05					<0,05				
P SH	0,80					0,91					1,00				
P Inibidor x SH	0,91					0,33					0,44				
P Trat x Controle	<0,05					<0,05					<0,05				

A diferença entre a média dos tratamentos e a média do controle foi identificada por * obtida pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.

A ausência de diferenças entre tratamentos com aplicação de N na produção de biomassa seca pode ser que não se repita em outro cultivo para o mesmo experimento como o deste trabalho. Em campo, por exemplo, os incrementos na produtividade de grãos observados numa determinada safra, pode não ocorrer em outra (AMADO et al., 2013), pois a disponibilidade de N no solo é muito dependente da precipitação pluviométrica, que tem relação com a umidade do solo, e a temperatura, além, do potencial de mineralização de N do próprio solo, que pode variar com o tempo. Sangoi, Ernani & Silva (2007), por exemplo, avaliaram a produtividade de grãos de milho em solo com alto teor de matéria orgânica (54 g kg⁻¹) com e sem aplicação de N. Foi observado que a produtividade de grãos do controle (sem N) diminuiu a cada safra, com valores de 9580, 7480 e 6040 kg ha⁻¹, enquanto que a produtividade dos tratamentos com aplicação de N aumentou, sendo 18, 40 e 47% superior à testemunha, respectivamente. A partir desses resultados, os autores concluíram que as plantas se tornaram mais responsivas a adubação nitrogenada a medida que o fornecimento de N pelo solo foi se tornando limitado, devido à redução do potencial de mineralização de N do solo, consequentemente, diminuindo a produtividade do controle.

Ademais, apesar da comprovada eficácia da UR tratada com NBPT na redução das perdas de N por volatilização de NH₃ (CANTARELLA et al., 2008; SOARES et al., 2012), os benefícios da UR tratada com NBPT em relação a UR convencional são menos consistentes ao considerar a produtividade das culturas, inclusive podendo não haver diferenças em certas condições, como constatado em vários trabalhos (SANZ-COBENA et al., 2012; ESPINDULA et al., 2013; SINGH et al., 2013). Nesses estudos, os autores atribuíram a ausência de maior produtividade, mesmo sendo a UR tratada com NBPT, ao fato do N não ser o fator limitante no desenvolvimento da cultura nas condições dos experimentos. Portanto, no presente estudo, pode ter ocorrido que a disponibilização de N-mineral oriundo da MOS tenha sido adequada para o crescimento e desenvolvimento do milho até o momento da colheita, apesar das diferenças entre inibidores nas perdas de NH₃ por volatilização. Em outras palavras, assim como relatado em outros estudos, pode ser que a disponibilidade de N não tenha sido o fator limitante na produtividade da cultura e sim outro fator desconhecido.

Outras razões que talvez expliquem a ausência de diferenças entre tratamentos nos atributos morfológicos e produção de biomassa seca são: 1) aplicação de dose única de N; 2) curto período de tempo entre a aplicação dos tratamentos e a avaliação, provavelmente insuficiente para que o N assimilado pela planta resultasse em incrementos na produção de biomassa (o período mais longo após aplicação dos tratamentos em cobertura foi de 41 dias);

e finalmente, o que é mais plausível, 3) a reduzida dose de N definida para o crescimento em vaso, associada às perdas de N por volatilização de NH_3 nos tratamentos com UR, como evidenciado neste trabalho.

4.3 Avaliações morfológicas do sistema radicular

O fornecimento de nutrientes às plantas pelo solo, especialmente de N, altera a morfologia, o crescimento e a distribuição de raízes (MARSCHNER, 1995). Considerando que nesse estudo aplicou-se a mesma dose de N-fertilizantes para todos os tratamentos, alterações na morfologia de raízes poderiam estar relacionadas com a disponibilidade de N no solo, após as perdas de NH_3 por volatilização do N-fertilizante, além do efeito bioestimulante no crescimento das raízes de milho causado pelas SH.

Em relação à morfologia do sistema radicular, raízes finas (0,5 – 2,0 mm) ou muito finas (< 0,5 mm) são responsáveis pela absorção de água e nutrientes, e as grossas (> 2,0 mm) pela fixação da planta ao solo (FITTER, 2002; SILVA et al., 2007b). Nesse contexto, comprimento, área superficial e volume são as principais características morfológicas das raízes responsáveis pela eficiência de utilização de nutrientes pelas plantas, principalmente devido ao aumento da superfície de contato entre as raízes e o solo (SCHACHTMAN et al., 1998; CANTÃO, 2007). Em solos com baixa disponibilidade de nutrientes, por exemplo, as raízes tendem a se desenvolver mais para explorar maior volume e satisfazer as necessidades nutricionais das plantas. Esse comportamento ocorre devido à alteração na relação fonte/dreno da planta que, sob condição de estresse, como falta de água ou nutrientes, transloca maior quantidade de fotoassimilados produzidos da parte aérea para formação de raízes (CLARKSON & HANSON, 1980).

No presente estudo, independentemente do inibidor de urease testado ou da concentração de SH, não houve diferenças no comprimento (Tabela 5), área superficial (Tabela 6) e volume (Tabela 7) de raízes grossas (> 2,0 mm), havendo diferenças apenas entre a média dos tratamentos adubados que se mostrou superior ao controle. De fato, segundo Linkohr et al. (2002), as plantas não apresentam grandes variações no comprimento da raiz principal (grossa) sob deficiência de N, e alterações na densidade de raízes laterais variam com a espécie em estudo. Já a ausência de diferenças entre as concentrações de SH em raízes grossas pode ser explicada pelo fato do composto orgânico promover estímulos no crescimento de raízes laterais ou adventícias (CANELLAS et al., 2012), geralmente mais finas, principalmente em monocotiledôneas.

Tabela 5 - Comprimento (m) das raízes de milho classificadas por classes de diâmetro e total, coletadas nos estádios V8 e VT, aos 52 e 62 dias após a semeadura, respectivamente.

Inibidor de urease	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média
	0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2	
1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)																
	Raiz muito fina (< 0,5 mm)				Raiz fina (0,5 -2,0 mm)				Raiz grossa (> 2,0 mm)				Total de raiz			
	Comprimento (m)															
0,40%B + 0,15% Cu	229 Aa	225 Ba	216 Aa	223	82	97	84	88	10,1	12,2	9,6	10,6	320 Aa	334 Ba	309 Aa	321
0,64% B	244 Aa	251 Ba	196 Aa	196	94	89	77	87	12,7	10,9	12,1	11,9	352 Aa	351 Ba	285 Aa	329
Ausente	308 Aa	164 Bb	285 Aa	285	103	69	99	90	9,2	11,2	9,1	9,8	420 Aa	244 Bb	394 Aa	353
NBPT	210 Ab	409 Aa	174 Ab	174	77	121	72	90	10,9	10,5	10,8	10,8	298 Ab	540 Aa	257 Ab	365
Média	248	262	218	218*	89	94	83	89*	10,7	11,2	10,4	10,8*	347	367	311	342*
Controle	-	-	-	175	-	-	-	63	-	-	-	7,1	-	-	-	245
P Inibidor		0,70				0,99				0,46				0,80		
P SH		0,42				0,66				0,76				0,44		
P Inibidor x SH		<0,20				0,29				0,79				<0,20		
P Trat x Controle				<0,20				<0,20				<0,20				<0,20
2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)																
0,40%B + 0,15% Cu	416	372	284	357 B	144	146	101	130 AB	12,0	11,0	10,4	11,2	572	528	396	499 B
0,64% B	365	558	482	468 A	129	173	140	147 A	10,7	12,8	10,4	11,3	505	744	633	627 A
Ausente	463	435	291	396 AB	174	154	129	152 A	9,5	12,6	14,4	12,2	647	601	435	561 AB
NBPT	251	320	195	255 C	118	126	99	114 B	11,4	15,3	12,4	13,0	380	461	306	382 C
Média	374 AB	421 A	313 B	369	141 a	150 a	117 b	136*	10,9	12,9	11,9	11,9*	526 ab	584 a	442 b	517
Controle	-	-	-	298	-	-	-	102	-	-	-	8,4	-	-	-	409
P Inibidor		<0,20				<0,20				0,77				<0,20		
P SH		<0,20				<0,20				0,52				<0,20		
P Inibidor x SH		0,63				0,80				0,82				0,66		
P Trat x Controle				0,41				<0,20				<0,20				0,31

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease na vertical e letras minúsculas a diferença entre as concentrações de SH na horizontal, ambas obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 20%. A diferença entre a média dos tratamentos e a média do controle foi identificada por *.

Tabela 6 – Área superficial (cm²) das raízes de milho classificadas por classes de diâmetro e total, coletadas nos estádios V8 e VT, aos 52 e 62 dias após a semeadura, respectivamente.

Inibidor de urease	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média
	0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2	
1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)																
	Raiz muito fina (< 0,5 mm)				Raiz fina (0,5 -2,0 mm)				Raiz grossa (> 2,0 mm)				Total de raiz			
	Área superficial (cm²)															
0,40%B + 0,15% Cu	536 Aa	527 Ba	524 Aa	529	699	878	743	774	337	360	323	340	1572 Aa	1766 Ba	1590 Aa	1643
0,64% B	527 Aa	576 Ba	453 Aa	519	893	804	705	800	398	351	374	375	1846 Aa	1731 Ba	1532 Aa	1703
Ausente	732 Aa	381 Bb	671 Aa	595	873	622	854	783	275	373	299	316	1879 Aa	1377 Ba	1825 Aa	1694
NBPT	468 Ab	966 Aa	390 Ab	608	688	1035	663	795	365	326	357	349	1522 Ab	2327 Aa	1410 Ab	1753
Média	566	613	510	563	1235	1308	1075	967*	344	353	338	345*	1705	1800	1589	1698*
Controle	-	-	-	415	-	-	-	554	-	-	-	212	-	-	-	1181
P Inibidor	0,73				0,99				0,52				0,96			
P SH	0,44				0,67				0,91				0,52			
P Inibidor x SH	<0,20				0,39				0,77				<0,20			
P Trat x Controle	0,21				<0,20				<0,20				<0,20			
2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)																
0,40%B + 0,15% Cu	945	855	615	805 B	1267	1275	924	1155	402	365	383	383	2615	2494	1922	2344 AB
0,64% B	830	1269	1113	1070 A	1133	1455	1199	1262	355	379	306	346	2318	3102	2617	2679 A
Ausente	1068	996	652	905 AB	1485	1348	1214	1349	313	406	436	385	2866	2749	2302	2639 A
NBPT	588	713	421	574 C	1056	1155	964	1058	453	453	381	429	2002	2321	1766	2030 B
Média	858 ab	958 a	700 b	715	1235	1308	1075	1206*	381	401	377	386*	2450 ab	2667 a	2152 b	2423*
Controle	-	-	-	839	-	-	-	867	-	-	-	253	-	-	-	1835
P Inibidor	<0,20				0,26				0,83				<0,20			
P SH	<0,20				0,20				0,68				<0,20			
P Inibidor x SH	0,59				0,87				0,85				0,81			
P Trat x Controle	0,52				<0,20				<0,20				<0,20			

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease na vertical e letras minúsculas a diferença entre as concentrações de SH na horizontal, ambas obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 20%. A diferença entre a média dos tratamentos e a média do controle foi identificada por *.

Tabela 7 – Volume (cm³) das raízes de milho classificadas por classes de diâmetro e total, coletadas nos estádios V8 e VT, aos 52 e 62 dias após a semeadura, respectivamente.

Inibidor de urease	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média
	0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2	
1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)																
	Raiz muito fina (< 0,5 mm)				Raiz fina (0,5 -2,0 mm)				Raiz grossa (> 2,0 mm)				Total de raiz			
	Volume (cm³)															
0,40%B + 0,15% Cu	55,7	63,9	58,8	59,5	26,5	32,1	27,5	28,7	4,8	6,5	4,8	5,4	87,0	102,5	91,1	93,5
0,64% B	70,2	64,0	58,9	64,4	31,0	25,5	23,5	26,7	5,7	3,9	4,0	4,5	106,9	93,3	86,4	96,7
Ausente	57,6	80,4	52,9	63,6	23,0	28,4	27,4	26,3	4,6	4,1	5,7	4,8	85,2	113,0	86,0	94,7
NBPT	65,7	63,9	64,0	64,5	24,6	32,1	28,1	28,3	4,2	6,5	5,2	5,3	94,5	83,7	97,3	91,8
Média	62,3	68,1	58,7	63,0*	26,3	29,5	26,6	27,5*	4,8	5,3	4,9	5,0*	93,4	99,7	90,2	94,3*
Controle	-	-	-	41,7	-	-	-	17,2	-	-	-	2,7	-	-	-	61,7
P Inibidor		0,91				0,93				0,87				0,99		
P SH		0,58				0,94				0,98				0,76		
P Inibidor x SH		0,44				0,92				0,64				0,74		
P Trat x Controle				<0,20				<0,20				<0,20				<0,20
2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)																
0,40%B + 0,15% Cu	91,1	85,6	67,8	81,5	37,2	37,1	30,0	34,8	6,3	3,9	3,8	4,7	135,2	126,6	101,5	121,1
0,64% B	80,0	103,2	87,4	90,2	33,9	35,5	32,8	34,1	4,3	4,1	4,4	4,3	118,2	142,8	124,6	128,5
Ausente	69,9	83,9	65,1	73,0	38,9	38,5	38,7	38,7	5,7	7,4	6,2	6,4	114,5	129,7	110,1	118,1
NBPT	96,5	94,8	82,5	91,3	39,4	36,4	46,8	40,9	3,2	4,1	7,9	5,0	139,0	135,3	137,2	137,2
Média	84,4 ab	91,9 a	75,7 b	84,0*	37,4	36,9	37,1	37,1*	4,9	4,9	5,6	5,1	126,7	133,6	118,3	126,2*
Controle	-	-	-	61,4	-	-	-	23,8	-	-	-	3,0	-	-	-	88,1
P Inibidor		0,21				0,50				0,43				0,54		
P SH		<0,20				0,98				0,81				0,46		
P Inibidor x SH		0,84				0,85				0,45				0,87		
P Trat x Controle				<0,20				<0,20				0,24				<0,20

Letras minúsculas representam a diferença estatística entre as concentrações de SH na horizontal obtida pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 20%. A diferença entre a média dos tratamentos e a média do controle foi identificada por *.

Observa-se nas tabelas 5, 6 e 7 que a classe de raízes finas (0,5 – 2,0 mm) teve comportamento semelhante à das raízes grossas, com a média dos tratamentos adubados sendo superior ao controle. A única exceção encontrada foi no comprimento de raízes finas (0,5 – 2,0 mm) em VT (Tabela 5). Nessa avaliação, independentemente da concentração de SH, o uso do NBPT proporcionou menor comprimento de raízes finas, diferindo-se dos tratamentos sem inibidor e com 0,64% B. Além disso, na média dos inibidores por dose de SH, a não adição de SH (0%) e adição de 0,6% de SH resultou em maior comprimento de raízes finas em comparação a 1,2% de SH na 2ª avaliação (estádio VT do milho). As maiores diferenças entre os tratamentos com inibidores de urease e concentrações de SH ocorreram no comprimento (Tabela 5) e área superficial de raízes muito finas (< 0,5 mm) (Tabela 6), em ambos períodos avaliados, os quais por apresentarem valores superiores às demais classes de diâmetro, influenciaram fortemente os resultados do total de raízes, sendo, por isso, semelhantes nos resultados da análise estatística. Por outro lado, o volume de raízes (muito finas e total) foi pouco influenciado pela aplicação dos tratamentos (Tabela 7).

Na avaliação do comprimento e área superficial de raízes muito finas em V8 (Tabelas 5 e 6), a análise estatística revelou efeito de interação entre inibidor e SH. Apenas na concentração de 0,6% SH houve diferença entre os inibidores de urease, em que o uso do NBPT destacou-se dos demais inibidores, promovendo maior comprimento e área superficial de raízes muito finas (Tabelas 5 e 6). Ainda nessa avaliação, com relação às concentrações de SH por inibidor de urease, a aplicação de 0,6% na UR convencional (sem inibidor) revelou o menor valor de raízes muito finas. Já quando associada ao NBPT, a mesma dose de SH (0,6%) promoveu o maior comprimento e área superficial de raízes muito finas. Para os inibidores 0,40% B + 0,15% Cu e 0,64% B, a aplicação de SH não promoveu diferenças nessa classe de raízes. A mesma interpretação estatística verificada para comprimento e área superficial de raízes muito finas em V8 pode ser aplicada para o total de raiz no mesmo estágio fenológico.

Em VT, assim como em V8, os resultados e interpretação da análise estatística do comprimento de raízes muito finas e total de raízes apresentaram semelhanças com os resultados de área superficial. Em ambos os estádios fisiológicos, não houve mais efeito de interação entre inibidor e SH, apenas entre as variáveis separadamente, tanto em raízes muito finas quanto no total de raízes. Em VT, o uso do NBPT e da concentração de 1,2% de SH apresentaram os menores valores de comprimento e área superficial (Tabelas 5 e 6), conseqüentemente, o pior desempenho na produção de raízes muito finas e total.

A disponibilidade de N tem grande relação com o crescimento de raízes laterais. Sob deficiência do elemento, a planta destina o crescimento radicular no sentido da produção de raízes finas para aumento da área de contato e maior exploração do volume de solo (ZHANG e FORDE, 1998). Nesse contexto, os tratamentos com o inibidor de urease mais eficaz, nesse caso o NBPT, tendem apresentar menor quantidade de raízes finas que os demais, pois havendo maior disponibilidade de N no sistema, a planta tenderia a priorizar o crescimento da parte aérea. A explicação para não ter ocorrido esse maior acúmulo de biomassa seca de parte aérea nos tratamentos com NBPT pode ser devido ao curto tempo de resposta entre a adubação e as amostragens de plantas.

Apesar das diferenças encontradas entre os inibidores de urease na mitigação das perdas do N na forma de NH_3 , de maneira geral, esse diferencial não foi suficiente para promover grandes mudanças na morfologia de raízes, tendo em vista as pequenas diferenças entre tratamentos. Note-se também que a aplicação de SH não teve efeito significativo tanto na biomassa seca de raízes quanto na promoção do crescimento de raízes laterais (comprimento, área superficial e volume), havendo diferenças apenas em alguns casos específicos, como em raízes muito finas. A ausência de efeitos significativos em raízes de milho deste experimento pode ser explicada pela forma de aplicação dos N-fertilizantes, método de irrigação adotado e forma de extração das SH e sua origem.

Tendo em vista o elevado número de estudos confirmando o efeito promotor de crescimento das SH sobre as plantas, buscou-se na literatura respostas que ajudassem a explicar a ausência do efeito fisiológico nesse trabalho. Primeiramente, inferiu-se que, apesar da solubilização da UR no solo, sua aplicação em cobertura impediria que as SH na superfície do fertilizante se solubilizassem adequadamente e penetrassem no solo, indo entrar em contato com as raízes. Isso pode ter ocorrido, pois durante todo o período de quantificação das perdas de NH_3 (15 dias), a terra nos vasos foi irrigada somente do lado oposto da faixa de aplicação do fertilizante, evitando-se o contato dos fertilizantes com a água e, consequentemente, sua incorporação no solo. Apesar do procedimento ter sido adotado para evitar a minimização do efeito dos inibidores de urease, a falta de contato da água com as SH teria impedido seu contato com as raízes da planta de milho durante esses 15 dias. Embora ao fim desse período a irrigação tenha sido realizada em toda superfície do solo nos vasos, ao se retirar os coletores de volatilização foi possível observar diversos pontos pretos sobre o solo onde os tratamentos com fertilizantes haviam sido aplicados, o que indicou que as SH, ou parte dela, ainda se encontrava na superfície (APÊNDICE D). Portanto, para obtenção de efeitos bioestimulantes nas raízes da planta, sugere-se que no uso prático de UR recoberta

com SH, o fertilizante seja incorporado ao solo por escarificação ou enterrio do mesmo, ou também com a chuva ou irrigação, permitindo que o composto orgânico entre em total contato com as raízes. Outra razão para o baixo estímulo na promoção de raízes laterais pode ser a fonte de extração das SH. Segundo Canellas et al. (2004), embora mais usadas comercialmente, a resposta fisiológica de plantas à aplicação de SH isoladas de linhito, leonardita e carvão sub-betuminoso são menores do que as SH extraídas de turfa ou vermicomposto.

As ações benéficas devidas ao uso de SH na produção vegetal tem sido atribuídas a duas ações complementares no sistema solo-planta, a saber: (i) efeitos consequentes de ações prévias nas propriedades e fertilidade do solo, mais conhecidos como efeitos indiretos (EI), os quais resultam principalmente da habilidade das SH de formar quelatos naturais estáveis ou complexos com metais no solo (STEVENSON et al., 1994); e (ii) efeitos consequentes da interação direta das SH com a membrana celular das raízes e superfície foliar, também conhecidos como efeitos diretos (ED), os quais afetam o crescimento da parte aérea e raízes das plantas por meio de vias de sinalização reguladas pelos principais hormônios vegetais como auxina, etileno e ácido abscísico (MORA et al., 2014). Em relação a primeira ação, destaque-se a influência sobre a reserva de nutrientes disponíveis para as plantas e microbiota do solo.

Percebe-se pelo contexto anterior que há uma série de fatores que podem influenciar a intensidade dos EI e ED sobre o desenvolvimento das plantas. Esses fatores podem ser classificados como intrínsecos, quando relacionados às propriedades físico-químicas intrínsecas das SH, como tamanho, conformação estrutural, distribuição de tamanho etc.; e extrínsecos, que seriam fatores relacionados ao manejo da cultura, presença de estresses bióticos ou abióticos, propriedades do solo, espécie de planta, dose, modo (solo ou foliar) e momento da aplicação (CHEN & AVIAD, 1990; ROSE et al., 2014).

O desenvolvimento assim como o uso de produtos com incorporação de SH em formulações NPK, como o utilizado nesse estudo, ainda é bastante escasso (BENEDETTI et al., 1992; GARCIA-MINA, 1992), apesar de ter crescido significativamente o uso de produtos contendo SH nos últimos anos. Isso se deve, provavelmente, ao limitado conhecimento dos potenciais efeitos da tecnologia na fabricação dos fertilizantes compostos, principalmente sobre a estabilidade e estrutura dos fertilizantes compostos, e, portanto, na eficiência agrônômica desses fertilizantes contendo SH (ERRO et al., 2016).

Segundo Chen & Aviad (1990), a dose de SH necessária na formulação de fertilizantes NPK para obtenção de efeitos bioestimulantes (ED) é muito alta (em torno de 75 kg ha^{-1}), e, por isso, pouco acessível ao produtor tanto do ponto de vista econômico quanto técnico. Por exemplo, considerando-se uma suposta dose de aplicação de 100 kg ha^{-1} de N em campo com os fertilizantes utilizados nesse estudo, seriam aplicados juntamente com a UR algo em torno de 2,4 e $5,8 \text{ kg ha}^{-1}$ de SH referentes as doses de 0,6 e 1,2% de SH, respectivamente, presentes no revestimento. Portanto, as baixas doses de SH empregadas nesse estudo talvez também tenham sido insuficientes para promoção de efeitos bioestimulantes e ajudariam explicar a ausência de efeitos significativos no crescimento de raízes e produção de biomassa seca de raízes e parte aérea de plantas de milho.

Além das limitações referentes à dose de aplicação das SH, a aplicação de aditivos no revestimento de grânulos NPK possui outros fatores limitantes como: (i) quantidade máxima do aditivo que pode ser adicionada adequadamente sobre o fertilizante; (ii) compatibilidade de aglutinação entre a composição do grânulo e o aditivo; (iii) estabilidade química do aditivo; e (iv) potencial de biodegradação dos ligantes e/ou aditivos na superfície dos grânulos de fertilizante (ERRO et al., 2016). Com efeito, foi preciso levar em consideração todos esses fatores para se chegar a dose mais adequada de SH a ser aplicada como material de revestimento da UR. Em outras palavras, apesar das recomendações de doses superiores para obtenção de efeitos bioestimulantes na planta, estas não seriam viáveis de serem aplicadas nas condições deste experimento devido a área de superfície dos grânulos de UR.

Apesar da recomendação feita por Chen & Aviad (1990), com respeito a dose ideal de aplicação de SH, trabalhos na literatura indicaram que os resultados de experimentos com AH ainda são muito inconsistentes, principalmente em campo. Em trabalho realizado por Crawford et al. (1969), a aplicação de 269 kg ha^{-1} de AH via solo resultou em pequeno aumento de produtividade em batata-doce (*Ipomoea batatas* L. Poir), além de ter ocorrido somente em 1 dos 3 anos avaliados. Quando a dose foi duplicada para 538 kg ha^{-1} , o aumento de produtividade ainda foi pequeno, apesar de observados em três anos de cultivo. Em outro estudo, a aplicação de 224 kg ha^{-1} de AH via solo aumentou a produtividade da cevada (*Hordeum vulgare* L.), independentemente da fonte de extração do AH, seja lodo de esgoto, composto, leonardita ou turfa (AYUSO et al., 1997). Mesmo a aplicação de doses excessivas de AH de leonardita ($81.805 \text{ kg ha}^{-1}$) não resultou em maior crescimento vegetativo ou rendimento de frutos em citrus, causando apenas aumento significativo no teor de MOS (NEMEC & LEE, 1992). Enquanto alguns trabalhos indicaram aumentos de produtividade após aplicação via solo e foliar em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) e algodão

(*Gossypium hirsutum* L.) (BROWNELL et al., 1987), outros não encontraram nenhuma diferença ao se aplicar doses recomendadas pelos fabricantes via solo em batata (*Solanum tuberosum* L.) em seis locais diferentes (ROWBERRY & COLLIN et al., 1977); e em milho, na dose de 560 kg ha⁻¹ em três anos (LAWLESS et al., 1984).

Devido essa inconsistência de resultados encontrados na literatura, não estando claro ainda a dose de melhor custo-benefício ou forma de aplicação ideal, recomenda-se que usuários que queiram avaliar a eficiência de um produto individual o façam em pequenas e diversificadas áreas de sua propriedade antes de investir em aplicações de larga escala.

4.4 Eficiência de uso do N-fertilizante pelo milho

A eficiência de uso ou aproveitamento do N-fertilizante e balanço do nutriente no sistema solo-planta foi avaliado pelo método isotópico com ¹⁵N. No solo, foram quantificados: nitrogênio total no solo (NTS), nitrogênio no solo proveniente do fertilizante (NSPF) e recuperação do N-fertilizante no solo (R) nos estádios V8 e VT do milho (Tabela 8); e na planta: N na planta proveniente do fertilizante (NPPF) e eficiência de uso do N-fertilizante (EUN) nos estádios V8 (Tabela 9) e VT do milho (Tabela 10). Em todas avaliações comparou-se os inibidores de urease, concentrações de SH e interação entre os dois fatores.

A apresentação dos resultados do N inorgânico de forma separada (N-NO₃⁻ e N-NH₄⁺) é interessante para avaliação das formas de N predominantes no solo após aplicação de fertilizantes nitrogenados. No entanto, quando a intenção é estudar a quantidade real de N disponível para planta em um determinado estágio fenológico da cultura, o mais adequado é apresentar o N-total no solo (NTS), soma das frações orgânica e inorgânica, cujos valores variam muito ao longo do ano, segundo as estações climáticas (POLETTTO; GROHS; MUNDSTOCK, 2008). Além disso, devido à variação nos valores obtidos de N-NH₄⁺ (ANEXO A), esses resultados não foram apresentados. Essas variações podem ter ocorrido tanto por erros experimentais no momento da amostragem do solo, quanto pelo dinamismo do N do solo, que devido a sua constante transformação dificulta a avaliação da sua disponibilidade (SANTOS, 2008). Assim, a apresentação e discussão desses resultados serão baseadas no NTS.

Tabela 8 – Nitrogênio total no solo (NTS) em mg vaso⁻¹, nitrogênio no solo proveniente do fertilizante (NSPF) em mg vaso⁻¹ e %, recuperação do N-fertilizante (R) em %, nos estádios V8 e VT do milho em função da aplicação dos tratamentos.

Inibidor de urease	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média	
	0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		
	NTS (mg vaso ⁻¹)				NSPF (mg vaso ⁻¹)				NSPF (%)				R (%) solo				
	1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)																
0,40%B + 0,15% Cu	7344	7259	7310	7304	83	87	99	90	1,1	1,2	1,4	1,2	3,5	3,7	4,2	3,8	
0,64% B	7276	6834	6800	6970	100	85	75	87	1,4	1,3	1,1	1,3	4,3	3,7	3,2	3,7	
Ausente	6970	7072	7038	7026	51	59	79	63	0,7	0,8	1,1	0,9	2,2	2,5	3,4	2,7	
NBPT	7174	7106	7004	7094	117	62	95	91	1,6	0,9	1,4	1,3	5,0	2,7	4,1	3,9	
Média	7191	7068	7038	7099	88	74	87	83	1,2	1,1	1,2	1,2	3,7	3,1	3,7	3,5	
Controle	-	-	-	7140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P Inibidor	0,27				0,07				0,11				0,07				
P SH	0,57				0,30				0,39				0,30				
P Inibidor x SH	0,87				0,20				0,31				0,20				
P Trat x Controle	0,85				-				-				-				
CV(%)	-				29,5				31,6				29,5				
	2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)																
0,40%B + 0,15% Cu	7140	7259	7480	7293 A	65	87	48	67 B	0,9	1,2	0,7	0,9 B	2,8	3,7	2,1	2,9 B	
0,64% B	7106	7072	7191	7123 AB	58	71	85	71 B	0,8	1,0	1,2	1,0 B	2,5	3,0	3,6	3,0 B	
Ausente	6834	6596	6970	6800 C	64	41	39	48 B	0,9	0,6	0,6	0,7 B	2,8	1,7	1,6	2,0 B	
NBPT	7344	6800	6834	6992 BC	153	67	106	109 A	2,0	1,0	1,5	1,5 A	6,5	2,9	4,5	4,6 A	
Média	7106	6932	7119	7052	85	66	70	74	1,2	1,0	1,0	1,03	3,6	2,8	3,0	3,14	
Controle	-	-	-	6970	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
P Inibidor	<0,05				<0,05				<0,05				<0,05				
P SH	0,25				0,40				0,44				0,40				
P Inibidor x SH	0,29				0,15				0,12				0,15				
P Trat x Controle	0,65				-				-				-				
CV(%)	-				48,2				42,8				48,3				

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease na vertical obtida pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.

Tabela 9 – Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF) em mg planta⁻¹ e %, e eficiência de uso do N-fertilizante pela planta (EUN) em % no estágio V8 do milho em função da aplicação dos tratamentos.

Inibidor de urease	SH (%)			Média	SH (%)			Média	SH (%)			Média
	0	0,6	1,2		0	0,6	1,2		0	0,6	1,2	
	Raiz				Parte aérea				Planta toda			
	NPPF (mg planta ⁻¹)											
0,40%B + 0,15% Cu	72	68	78	73 BC	617	710	654	660 B	688	777	732	732 C
0,64% B	116	91	80	96 B	764	794	800	786 A	880	885	880	881 B
Ausente	70	62	68	67 C	616	519	543	560 C	686	581	611	626 D
NBPT	145	107	122	125 A	976	749	867	864 A	1121	857	989	989 A
Média	101 a	82 a	88 a	90	743 a	693 a	716 a	717	844 a	775 a	803 a	807
P Inibidor	<0,05				<0,05				<0,05			
P SH	0,20				0,36				0,26			
P Inibidor x SH	0,74				0,09				0,17			
CV (%)	28,3				11,9				12,6			
	NPPF (%)											
0,40%B + 0,15% Cu	43,9	41,2	46,7	44,0 B	43,4	41,9	48,9	44,7 A	43,4	41,8	48,6	44,6 A
0,64% B	51,8	49,2	48,1	49,7 A	46,1	55,4	47,7	49,7 A	46,7	54,7	47,7	49,7 A
Ausente	38,3	39,7	37,2	38,4 C	43,9	45,3	42,5	43,9 A	43,2	44,6	41,8	43,2 A
NBPT	54,4	51,3	47,9	51,2 A	54,4	52,1	45,7	50,7 A	54,4	51,9	46,0	50,8 A
Média	47,1 a	45,4 a	45,0 a	45,8	46,9 a	48,7 a	46,2 a	47,3	46,9 a	48,3 a	46,0 a	47,1
P Inibidor	<0,05				0,16				0,09			
P SH	0,57				0,71				0,75			
P Inibidor x SH	0,67				0,49				0,50			
CV (%)	11,3				16,1				15,3			
	EUN (%)											
0,40%B + 0,15% Cu	3,1	2,9	3,4	3,1 BC	26,4	30,3	27,9	28,2 B	29,4	33,2	31,3	31,3 C
0,64% B	5,0	3,9	3,4	4,1 B	32,6	33,9	34,2	33,6 A	37,6	37,8	37,6	37,7 B
Ausente	3,0	2,6	2,9	2,8 C	26,3	22,2	23,2	23,9 C	29,3	24,8	26,1	26,8 D
NBPT	6,2	4,6	5,2	5,3 A	41,7	32,0	37,0	36,9 A	47,9	36,6	42,3	42,3 A
Média	4,3 a	3,5 a	3,7 a	3,8	31,8 a	29,6 a	30,6 a	30,7	36,1 a	33,1 a	34,3 a	34,5
P Inibidor	<0,05				<0,05				<0,05			
P SH	0,20				0,36				0,26			
P Inibidor x SH	0,74				0,09				0,17			
CV (%)	28,4				11,9				12,6			

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease na vertical e letras minúsculas a diferença entre as concentrações de SH na horizontal obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.

Tabela 10 – Nitrogênio na planta proveniente do fertilizante (NPPF) em mg planta⁻¹ e %, e eficiência de uso do N-fertilizante pela planta (EUN) em % no estágio VT do milho em função da aplicação dos tratamentos.

Inibidor de urease	SH (%)				Média	SH (%)				Média	SH (%)				Média
	0	0,6	1,2			0	0,6	1,2			0	0,6	1,2		
	Raiz					Parte aérea					Planta toda				
	NPPF (mg planta ⁻¹)														
	0,40%B + 0,15% Cu	101 Ba	87 Aa	83 ABa	90	767 Ba	713 Ba	678 Ba	719	868 Ba	800 Ba	761 Ba	810		
0,64% B	109 Ba	100 Aa	113 Aa	107	864 Ba	761 ABa	942 Aa	855	973 Ba	861 ABa	1055 Aa	963			
Ausente	57 Ca	70 Aa	63 Ba	64	518 Ca	528 Ca	464 Ca	503	576 Ca	598 Ca	527 Ca	567			
NBPT	180 Aa	99 Ab	105 Ab	128	1164 Aa	862 Ab	770 Bb	932	1344 Aa	960 Ab	875 Bb	1060			
Média	112	89	91	97	828	716	714	753	940	805	805	850			
P Inibidor	<0,05					<0,05					<0,05				
P SH	<0,05					<0,05					<0,05				
P Inibidor x SH	<0,05					<0,05					<0,05				
CV (%)	22,9					11,2					11,10				
NPPF (%)															
0,40%B + 0,15% Cu	43,7	40,2	36,1	40,0 B	55,7	50,7	48,2	51,5 A	54,0	49,2	46,4	49,9 A			
0,64% B	45,7	43,7	48,0	45,8 A	53,0	56,0	56,6	55,2 A	52,1	54,2	55,6	53,9 A			
Ausente	31,4	31,6	30,9	31,3 C	46,2	45,5	39,5	43,7 B	44,1	43,5	38,3	41,9 B			
NBPT	58,7	44,9	46,4	50,0 A	61,0	51,7	52,7	55,1 A	60,6	50,9	52,0	54,5 A			
Média	44,9 a	40,1 a	40,4 a	41,5	54,0 a	51,0 a	49,3 a	51,4	52,7 a	49,4 a	48,1 a	50,1			
P Inibidor	<0,05					<0,05					<0,05				
P SH	0,10					0,23					0,19				
P Inibidor x SH	0,26					0,60					0,53				
CV (%)	14,0					13,1					12,4				
EUN (%)															
0,40%B + 0,15% Cu	4,3 Ba	3,7 Aa	3,5 ABa	3,9	32,8 Ba	30,5 Ba	29,0 Ba	30,7	37,1 Ba	34,2 Ba	32,5 Ba	34,6			
0,64% B	4,7 Ba	4,3 Aa	4,8 Aa	4,6	36,9 Ba	32,5 ABa	40,2 Aa	36,6	41,6 Ba	36,8 ABa	45,1 Aa	41,1			
Ausente	2,5 Ca	3,0 Aa	2,7 Ba	2,7	22,2 Ca	22,5 Ca	19,8 Ca	21,5	24,6 Ca	25,5 Ca	22,5 Ca	24,2			
NBPT	7,7 Aa	4,2 Ab	4,5 Ab	5,5	49,7 Aa	36,8 Ab	32,9 Bb	39,8	57,4 Aa	41,0 Ab	37,4 Bb	45,3			
Média	4,8	3,8	3,9	4,2	35,4	30,6	30,5	32,2	40,2	34,4	34,4	36,3			
P Inibidor	<0,05					<0,05					<0,05				
P SH	<0,05					<0,05					<0,05				
P Inibidor x SH	<0,05					<0,05					<0,05				
CV (%)	22,9					11,3					11,2				

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease na vertical e letras minúsculas a diferença entre as concentrações de SH na horizontal, ambas obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.

O teste de médias revelou que não houve efeito significativo para os tratamentos para NTS (mg vaso⁻¹), NSPF (mg vaso⁻¹ e %) e R (%) em V8 (Tabela 8). O mesmo já não ocorreu no segundo período de amostragem (VT). Em VT, ocorreram diferenças no NTS entre os inibidores de urease, em que o inibidor 0,40% B + 0,15% Cu apresentou valor superior em comparação ao sem inibidor. O resultado indicou que o uso da UR convencional pode resultar em maiores perdas de N do sistema solo-planta, principalmente por volatilização, permanecendo menos N no solo disponível para planta. Nesse contexto, esperava-se que o inibidor de maior eficiência (NBPT), apresenta-se a maior concentração de NTS em comparação aos demais.

Na Tabela 8, em VT, ao se relacionar os resultados de NTS com o NSPF (mg vaso⁻¹ e %) e R (%), nota-se certa incoerência na interpretação conjunta dos fatores. Verificou-se pelo NSPF (mg vaso⁻¹ e %) e R (%) que o uso do NBPT resultou em maior eficiência na redução de perdas de N-fertilizante devido aos maiores valores recuperados no solo. Já para os demais inibidores, 0,40%B + 0,15%Cu, 0,64% B e sem inibidor, não houve diferença, embora 0,40% B + 0,15% Cu e 0,64% B tenham apresentado valores superiores ao sem inibidor. O mesmo resultado ou interpretação dos dados da análise estatística não ter sido encontrado em NTS pode ser explicado pela inclusão de raízes muito finas juntamente com o solo, que alteraram os resultados de N orgânico das amostras. É preciso também considerar que a amostragem do solo pode não ter sido representativa se considerarmos que todas as URs foram aplicadas de maneira localizada na superfície, dificultando a homogeneização do solo na amostragem.

Os resultados da Tabela 8 revelaram ainda que não houve nenhuma diferença entre as concentrações de SH no NTS, NSPF e R. Em princípio, esperava-se que o efeito fisiológico proporcionado pelas SH promoveria maior crescimento de raízes e, conseqüentemente, maior aproveitamento do N-fertilizante. No entanto, nenhum dos tratamentos com SH diferiram daqueles sem sua aplicação, o que, como já explicado, pode ter ocorrido devido a não incorporação dos tratamentos no solo, durante os 15 dias de avaliações de perdas de NH₃, o que, de alguma forma, interferiu numa possível ação das SH sobre as raízes.

Para o aproveitamento do N-fertilizante pelas plantas de milho, no estágio V8, não foi verificado efeito significativo de interação inibidor x SH nem de SH para NPPF (mg planta⁻¹) e EUN ($p > 0,05$) (Tabela 9). Houve efeito significativo somente para inibidor ($p \leq 0,05$). Independentemente do compartimento da planta, (raiz, parte aérea, ou planta toda), o tratamento sem a adição de inibidores de urease, resultou nos menores valores de NPPF (mg planta⁻¹) e EUN no estágio V8 do milho. Resultados semelhantes foram obtidos em VT na parte aérea e planta toda (Tabela 10). Esses resultados estão indicando que a aplicação da UR

convencional em superfície resultou em menor aproveitamento do N-fertilizante pela planta, principalmente devido as elevadas perdas de NH_3 por volatilização.

Com relação ao desempenho dos demais inibidores de urease, o NPPF e EUN em V8 revelaram comportamento semelhante ao observado nas perdas de NH_3 por volatilização. Em ambos, o NBPT promoveu maior eficiência de uso do N-fertilizante, resultando nos maiores valores de NPPF e EUN em raízes e planta toda (Tabela 9). Somente na avaliação da parte aérea da planta houve comportamento semelhante do NBPT com 0,64% B, sem diferença entre eles. O segundo inibidor de maior destaque no aumento do aproveitamento de N-fertilizante foi o 0,64% B, com exceção de raízes em que teve valor semelhante ao 0,40%B + 0,15%Cu. A aplicação exclusiva e mais concentrada de B no tratamento da UR mostrou-se superior ao 0,40% B + 0,15% Cu em NPPF (mg planta^{-1}) e EUN (%), provando, nas condições deste experimento, sua maior eficiência na redução de perdas de NH_3 . Por fim, o inibidor 0,40% B + 0,15% Cu mostrou-se o menos eficiente entre os inibidores na redução de perdas de NH_3 por volatilização, por apresentar os menores valores de NPPF (mg planta^{-1}) e EUN (%) tanto na parte aérea como na planta toda, superando apenas a UR convencional (na parte aérea e planta toda).

No estágio VT (Tabela 10), o teste de médias revelou interação significativa entre inibidores de urease e SH em NPPF (mg planta^{-1}) e EUN (%), porém somente o inibidor NBPT apresentou diferenças. Nas partes da planta (raízes, parte aérea e planta toda), as doses de 0,6% e 1,2% de SH no NBPT reduziram a eficiência de uso de N pelo milho (menores valores de NPPF - mg planta^{-1} e EUN) em relação ao tratamento sem SH; não havendo diferença entre as concentrações de 0,6 e 1,2% de SH. Na planta toda, verificou-se que na ausência de SH (0% SH) o NBPT mostrou-se o inibidor mais eficiente. No entanto, a medida que se adicionou SH (0,6% SH), seu desempenho foi prejudicado, igualando-se ao 0,64% B, e, posteriormente, ao 0,40%B + 0,15% Cu na dose de 1,2% SH. O mesmo efeito prejudicial não foi observado nos demais inibidores de urease (0,64% B e 0,40%B + 0,15%Cu) e na UR convencional, não havendo diferenças em NPPF (mg planta^{-1}) e EUN (%) nas concentrações de SH.

Para os inibidores 0,40% B + 0,15% Cu e 0,64% B em VT (Tabela 10), não houve diferença entre eles no NPPF (mg planta^{-1}) e EUN (%) nas raízes, em nenhuma das doses de SH. Somente na concentração mais elevada de SH (1,2%), o inibidor 0,64% B revelou melhor aproveitamento do N-fertilizante na parte aérea e planta toda de milho. Em 0 e 0,6% SH, o desempenho dos inibidores 0,40% B + 0,15% Cu e 0,64% B foram semelhantes em parte aérea e planta toda ($p \leq 0,05$).

4.5 Balanço de ^{15}N no sistema solo-planta

Apesar das diferenças entre inibidores de urease na EUN, a maior parte do N-fertilizante aplicado não foi recuperado no sistema solo-planta, pois todos apresentaram valores não recuperados superiores a 50% do N aplicado no estágio V8 do milho (Figura 13). Um dos fatores responsáveis pela baixa recuperação de N são as elevadas perdas do nutriente por volatilização de NH_3 . Sabe-se que a atividade da urease depende da umidade do solo. A taxa de hidrólise da UR aumenta à medida que o teor de umidade do solo se eleva até atingir 20%, sendo posteriormente pouco alterada pelo teor de água no solo (BREMNER & MULVANEY, 1978). Com base nessa informação, é possível que o método de irrigação adotado no experimento, com aplicação da água sempre no lado oposto da aplicação da UR, tenha potencializado as perdas de NH_3 por volatilização.

Acredita-se que as aplicações diárias de água visando a manutenção da CMRA do solo a 50% manteve a superfície do solo úmida, possibilitando a constante solubilização e hidrólise enzimática da UR no solo. Além disso, a irrigação somente do lado oposto pode ter intensificado as perdas de NH_3 junto a evaporação da água no solo (FRENEY et al., 1985).

Figura 13 – Balanço de nitrogênio do fertilizante (^{15}N) no sistema solo-planta avaliado no estágio V8 do milho. Letras distintas após o valor percentual indicam diferença na recuperação entre os inibidores de urease pelo teste LSD de Fischer ($p \leq 0,05$).

Os resultados do N não recuperado (Figuras 13 e 14) no balanço de N no sistema solo-planta são coerentes com os resultados de perdas cumulativas de NH_3 por volatilização após 15 dias (Figuras 8B e 11C). Em outras palavras, as perdas de NH_3 por volatilização estão diretamente relacionadas com a não recuperação do N-fertilizante. Em ambos os períodos, V8 e VT, não houve diferença entre inibidores de urease ou concentrações de SH na recuperação do N-fertilizante no solo. A quantidade de N recuperado pela planta toda de milho foi

inversamente relacionada com o N não recuperado do sistema. Considerando que em V8 não houve efeito significativo para SH ou de interação entre inibidores de urease e SH, somente se verificando efeito para os inibidores, a maior quantidade de N recuperado e menor para o N não recuperado no sistema solo-planta foi verificado para o tratamento com NBPT, seguindo-se 0,64% B, 0,40% B + 0,15% Cu, e sem inibidor de urease.

Em VT, o N não recuperado no balanço do N-fertilizante no sistema solo-planta revelou-se, como em V8, semelhante aos resultados de perdas cumulativas de NH_3 (15 DAF) (Figura 14). Diferentemente de V8, a análise estatística indicou haver efeito de interação entre inibidor de urease e SH ($p \leq 0,05$) havendo diferenças para 0,64% B e NBPT. Para o tratamento com 0,64% B, apesar de não haver diferença entre o N recuperado na planta nas concentrações de SH, o N não recuperado na dose de 0,6% SH mostrou ser maior em relação a 1,2% SH. Para o NBPT, a adição de SH reduziu o N-fertilizante recuperado pela planta, não havendo diferenças entre as concentrações de 0,6 e 1,2% SH.

Apesar das semelhanças na interpretação dos dados de volatilização e o N não recuperado, esse último mostrou-se superior aos de perdas cumulativas de NH_3 . Por exemplo, enquanto o tratamento NBPT sem adição de SH resultou em perdas cumulativas de NH_3 em torno de 7,1% após 15 dias (Figura 11C), o balanço de N no sistema solo-planta em VT indicou que 36% do N-fertilizante não foi recuperado no sistema solo-planta (Figura 14). Isso pode estar indicando que o N perdido no sistema solo-planta foi bem superior àquele quantificado pelos coletores de volatilização. Por se tratar de um experimento de casa de vegetação conduzido somente até o estágio VT, perdas de N do solo por lixiviação e desnitrificação ou pela parte aérea, na forma de NH_3 junto a corrente transpiratória, na senescência foliar (HARPER & SHARPE, 1995) podem ser descartadas, atribuindo-se, portanto, a diferença entre a quantidade volatilizada de NH_3 e o N não recuperado a baixa eficiência de captura de NH_3 nos coletores. Novamente, nota-se que, comparações quantitativas de perdas de NH_3 e interpretações de resultados devem ser feitas somente entre tratamentos para um mesmo experimento e com um mesmo método, não sendo recomendado a extrapolação dos resultados para condições de campo.

Embora tenha ocorrido diferenças entre tratamentos nas taxas de volatilização de NH_3 e eficiência de uso do N-fertilizante, o maior ou menor aproveitamento de N pela planta não se converteu em biomassa seca, provavelmente devido ao curto período de tempo entre a aplicação dos tratamentos e as avaliações, o qual teria sido insuficiente para transformar o N da planta em material vegetal. Acreditava-se também que a aplicação das SH pudesse não somente estimular o crescimento de raízes (ZANDONADI et al., 2007; CANELLAS et al.,

2010), e da parte aérea (MORA et al., 2014), mas também aumentar a eficiência de uso de nutrientes por meio da formação de quelatos naturais estáveis com metais do solo (QUAGGIOTTI et al., 2004; ÇELIK et al., 2010). Esperava-se também o melhor aproveitamento do N-fertilizante com a aplicação das SH devido a elevada CTC dos AH que conservaria o N na forma de NH_4^+ , evitando sua transformação para NH_3 (KASIM et al., 2009); no entanto, esses não foram os resultados encontrados.

Buscando trabalhos que ajudassem a explicar a ausência de efeito sinérgico entre as SH e o aproveitamento do N da UR, Sanchez-Diaz & Garcia-Mina (1994) afirmaram que, apesar da possível interação entre SH e UR por meio da formação de pontes de hidrogênio entre grupos carboxílicos e fenólicos protonados, principalmente em pH ácido, esses complexos não seriam estáveis suficientes para manter as moléculas de UR ligadas a estrutura das SH, ao entrarem em contato com o solo. Stevenson et al. (1994) afirmaram que a natureza monovalente do cátion NH_4^+ permite a formação de sais iônicos com grupos funcionais oxigenados das SH em pH alcalino. No entanto, essas ligações iônicas seriam bastante frágeis, incapazes de proteger o íon e mantê-lo na forma original. Essa afirmação talvez explique a razão dos tratamentos com SH não terem aumentando a eficiência de uso do N da UR.

Alguns estudos também enfatizaram que, quando aplicada em formulados NPK, a ação benéfica das SH sobre o N é bastante baixa, e ocorreriam provavelmente devido ao aumento da absorção pela planta de outros nutrientes que estariam em baixa biodisponibilidade no solo, como Fe e Zn em solos calcários e P em solos calcários e ácidos (CHEN & AVIAD, 1990; GARCIA-MINA, 1992; CHEN, De NOBILI & AVIAD, 2004). Novamente, a reduzida resposta positiva da interação SH-N ocorreria devido à baixa força de ligação da UR e NH_4^+ (pontes de hidrogênio e ligação iônica) com os sítios aniônicos das SH (STEVENSON et al., 1994). Para obtenção de efeitos diretos das SH e aumento do transporte de N nas raízes das plantas, Mora et al. (2014) e Canellas et al. (2015) recomendaram a adição do N-fertilizante (UR, NH_4^+ e NO_3^-) em formulações líquidas contendo SH, podendo ser aplicado via foliar ou na irrigação por gotejamento (fertirrigação). Dessa maneira, seria possível obter resultados mais consistentes com o uso de SH na agricultura.

Figura 14 – Balanço de nitrogênio (N) no sistema solo-planta avaliado no estágio VT do milho. Letras maiúsculas distintas após o valor percentual indicam diferença na recuperação entre os inibidores de urease, e letras minúsculas a diferença entre as concentrações de SH, ambas obtidas pelo teste LSD de Fischer ($p \leq 0,05$).

5. CONCLUSÕES

Comparando o desempenho dos inibidores de urease (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; e NBPT), o NBPT é o mais eficiente na redução das perdas de NH_3 por volatilização, consequentemente, aquele que também promove o maior aproveitamento de N pela planta.

O aumento da concentração de H_3BO_3 (0,64% B) no tratamento da UR promove maior redução nas perdas de NH_3 por volatilização do que o tratamento B + Cu (0,40% B + 0,15% Cu), assim como maior aproveitamento de N pelo milho no estágio V8. Com a adição da concentração mais elevada de SH (1,2% SH) na UR, o desempenho dos dois inibidores se iguala, sugerindo que a adição do composto orgânico prejudica a eficiência do inibidor 0,64% B.

A adubação com UR tratada com inibidores de urease mais SH não aumenta a taxa de produção de biomassa seca da parte aérea ou de raízes de milho. Da mesma forma, não há efeito da adição de SH nas características morfológicas do sistema radicular do milho, pois não há aumentos em comprimento, área superficial ou volume total de raízes nos estádios V8 e VT do milho.

A aplicação de SH como material de revestimento da UR não aumenta a eficiência de uso de N pelo milho em V8 ou VT, independentemente da adição de inibidores de urease. Em V8, a adição do composto orgânico promove, inclusive, efeito antagônico, pois reduz o aproveitamento de N pela planta.

REFERÊNCIAS

- ABBRUZZINI, T. F. **Qualidade e quantidade da matéria orgânica do solo em cultivo convencional e orgânico de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2011. 92 p. Dissertação de Mestrado.
- ALDRICH, S.R. SCOTT, W.O.; LENG, E.R. **Modern corn production**. 2.ed. Champaign: A & L, Publication, 1982. 371 p.
- ALKANANI, T., MACKENZIE, A.F., BLENKHORN, H. Volatilization of ammonia from urea-ammonium nitrate solutions as influenced by organic and inorganic additives. **Fertilizer Research**. 23, 113–119, 1990.
- ALVAREZ, R., STEINBACH, H.S. Modeling apparent nitrogen mineralization under field conditions using regressions and artificial neural networks. **Agronomy Journal**. 103, 1159–1168. 2011.
- AMADO, T. J. C. Culturas de cobertura, acúmulo de nitrogênio total no solo e produtividade do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, n. 23, p. 679-686, 1997.
- AMADO, T.J.C.; VILLALBA, E.O.H.; BORTOLOTO, R.P.; SANTI, A.L.; LEÓN, E.A.B.; MENEFE, D.; KUNZ, J. Efficiency of nitrogen fertilizer applied at corn sowing in contrasting growing seasons in Paraguay. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 1641-1650, 2013.
- AMARAL FILHO, J. P. R.; FORNASIERI FILHO, D.; FARINELLI, R.; BARBOSA, J. C. 2005. Espaçamento, densidade populacional e adubação nitrogenada na cultura do milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.29, n.3, p.467-473.
- ANDREUCCI, M.A. **Perdas nitrogenadas e recuperação aparente de nitrogênio em fontes de adubação do capim elefante**. 2007. 102p. Dissertação de (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.
- APOSTOLOPOULOU, E. **The global market for slow-release, controlled-release and stabilized fertilizers**. Beijing: International Fertilizer Association – IFA, 2016. 19 p.

ARAÚJO, L.A.N.; FERREIRA, M.E.; CRUZ, M.C.P. Adubação nitrogenada na cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, n.8, p.771-777, 2004.

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

ASLI, S., NEUMANN, P.M. Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. **Plant Soil** 336, 313–322. 2010.

AYUSO, M., J.L. MORENO, T. HERNANDEZ, AND C. GARCIA. 1997. Characterization and evaluation of humic acids extracted from urban waste as liquid fertilizers. **J. Sci. Food Agr.** 75:481–488.

AZCONA, I., PASCUAL, I., AGUIRREOLEA, J., FUENTES, M., GARCIA-MINA, J.M., SANCHEZ-DIAZ, M. Growth and development of pepper are affected by humic substances derived from composted sludge. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**. 174, 916–924. 2011.

BANERJEE, M. R.; BURTON, D.J.; GRANT, C.A. Influence of urea fertilization and urease inhibitors on the size and activity of soil microbial biomass under conventional and zero tillage at two sites. **Canadian Journal of Soil Science**. v.79, p. 255-263, 1999.

BARRIE, A.; PROSSER, S.J. Automated analysis of light-element stable isotopes by isotope ratio mass spectrometry. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S. (Ed.) **Mass spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996, p. 1 – 46.

BARROS, M.C.P.; PAULA, J.R.; REZENDE, M.O.O. Caracterização físico-química do ácido húmico de solo da ilha de Cananéia e de sua interação com Fe (III), Cu (II) e Cd (II). **Química Nova**, São Paulo, v.17, n.5, p. 376-380, 1994.

BATAGELLO, H.H.; LEITE, J.M.; TRIVELIN, P.C.O. **Extração de N-NH₄⁺ de espumas utilizadas para quantificação de NH₃ volatilizada**. VII Simpósio Científico dos Pós-graduandos do CENA. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba-SP, 2014.

BAYER, C. & MIELNICZUK, J. Características químicas do solo afetadas por métodos de preparo e sistemas de cultura. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 21:105-112, 1997.

BENDER, R.R.; HAEGELE, J.W.; RUFFO, M.L.; BELOW, F.E. **Nutrient uptake, partitioning, and remobilization in modern transgenic insect-protected maize hybrids.** Agronomy Journal, Madison, 2013, v.105, p. 161-170.

BENEDETTI, A.; FIGLIOLA, A.; IZZA, C.; INDIATI, R.; CANALI, S.; Fertilization with NPK and humate NPK: plant yield and nutrient dynamics. **Suelo y Planta.** 1992;2:203–14.

BENINI, S.; RYPNIEWSKI, W.R.; WILSON, K.S.; MANGANI, S.; CIURLI, S. Molecular details of urease inhibition by boric acid: insights into the catalytic mechanism. **Journal of the American Chemical Society.** v. 126: p. 3714-3715, 2004.

BENITES, V.M.; MÁDARI, B.; MACHADO, P.L.O.A. **Extração e fracionamento quantitativo de substâncias húmicas do solo: um procedimento simplificado e de baixo custo.** Rio de Janeiro, Embrapa (Comunicado Técnico, 16) 7p. 2003.

BERGAMASCHI, H.; DALMAGO, G.A.; BERGONCI, J.I.; BIANCHI, C.A.M.; MÜLLER, A.G.; COMIRAN, F.; HECKLER, B.M.M. Distribuição hídrica no período crítico do milho e produção de grãos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** 39(9), 831-839. 2004.

BHOM, W. **Methods of studying root systems.** New York: Springer-Verlag, 1979, 189 p.

BILLINGHAM, K. **Humic Products – Potential or Presumption for Agriculture.** NSW Department of Primary Industries, Orange, NSW, Australia, 2012.

BYRNES, B.H. Liquid fertilizers and nitrogen solutions. In: INTERNATIONAL FERTILIZER DEVELOPMENT CENTER. **Fertilizer manual.** Alabama: Kluwer Academic, 2000. p.20-44

BOUMA, T.J.; NIELSEN, K.L.; KOUTSTAAL, B. Sample preparation and scanning protocol for computerized analysis of root length and diameter, **Plant and Soil,** Dordrecht, v. 218, p. 185-196, 2000.

BREMNER, J. M.; DOUGLAS, L. A. Inhibition of urease activity in soils. **Soil Biology Biochemistry,** v. 3, p. 297-307, 1971.

BREMNER, J.M. & MULVANEY, R.L. Urease activity in soil. In: **Soil enzymes**. 1978. p.149.

BROWNELL, J.R., G. NORDSTROM, J. MARIHART, AND G. JORGENSEN. 1987. Crop responses from two new leonardite extracts. **The Sci. of the Total Environ.** 62:491–499.

BÜLL, L.T. Nutrição mineral do milho. In: BÜLL, L.T. & CANTARELLA, H. (ed.) **Cultura do milho; fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1993. p.63-145.

BURESH, R.J.; AUSTIN, E.R.; CRASWELL, E.T. Analytical methods in ^{15}N research. **Fertilizer Research**, The Hague, v.3, p. 37-62, 1982.

CAMARGO, F.A.O.; GIANELLO, C.; TEDESCO, M.J. & VIDOR C. Nitrogênio do solo. In: Santos, G.A. & CAMARGO, F.A.O. (eds.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo – Ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre, Genesis, 1999. p. 117-37.

CAMBARDELLA, C.A.; ELLIOT, E.T. Particulate soil organic matter changes across a grassland cultivation sequence. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 56, p. 777-783, 1992.

CANCELLIER, E. L.; SILVA, D. R. G.; FAQUIN, V.; ALMEIDA, B. A.; CANCELLIER, L. L.; SPEHAR, C. R. Ammonia volatilization from enhanced-efficiency urea on no-till corn in Brazilian cerrado with improved soil fertility. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, p. 15-23, 2016.

CANELLAS, L. P.; SANTOS, G. A.; RUMJANEK, V. M.; MORAES, A. A.; GURIDI, F. Distribuição da matéria orgânica e características de ácidos húmicos em solos com adição de resíduos de origem urbana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, p.1529-1538, 2001.

CANELLAS, L.P.; VELLOSO, A.C.X.; MARCIANO, C.R.; RAMALHO, J.F.G.P.; RUMANEK, V.M.; REZENDE, C.E.; SANTOS, G.A. Propriedades químicas de um cambissolo com cultivado cana-de-açúcar, com preservação do palhico e adição de vinhaça por longo tempo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, p.27, p. 935-944, 2003.

CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Chemical nature of soil humified fractions and their bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.39, p.233-240, 2004.

CANELLAS, L.P.; SANTOS, G.A. **Humosfera**: tratado preliminar sobre a química das substâncias húmicas. Campo dos Goytacazes: Editora UENF, 309 p. 2005.

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

CANELLAS, L.P., DOBBSS, L.B., OLIVEIRA, A.L., CHAGAS, J.G., AGUIAR, N.O., RUMJANEK, V.M., NOVOTNY, E.H., OLIVARES, F.L., SPACCINI, R., PICCOLO, A. Chemical properties of humic matter as related to induction of plant lateral roots. **European Journal of Soil Science**. 63, 315–324. 2012.

CANELLAS, L.P., BALMORI, D.M., MEDICI, L.O., AGUIAR, N.O., CAMPOSTRINI, E., Rosa, R.C.C., FAÇANHA, A.R., Olivares, F.L. A combination of humic substances and *Herbaspirillum seropedicae* inoculation enhances the growth of maize (*Zea mays* L.). **Plant Soil** 366, 119–132, 2013.

CANELLAS LP, OLIVARES FL, AGUIAR NO, JONES DL, NEBBIOSO A, MAZZEI P, PICCOLO A. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**. 2015;196:15–27.

CANTÃO, F. R. O. **Marcadores morfológicos de raiz em genótipos de milho contrastantes para tolerância à seca em resposta a estresses de fósforo e alumínio**. 2007. 98p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

CANTARELLA, H.; ROSSETTO, R.; BARBOSA, W.; PENNA, M.J.; RESENDE, L.C.L. Perdas de N por volatilização da amônia e resposta da cana-de-açúcar à adubação nitrogenada em sistema de colheita de cana sem queima prévia. In: 7. Congresso Nacional da STAB. Londrina: **Anais...:STAB**, v. 7, p. 82-87, 1999.

CANTARELLA, H.; CORRÊA, L.de A.; PRIMAVESI, A.C.; PRIMAVESI, O.; FREITAS, A.R.de; SILVA, A.G. da. Ammonia losses by volatilization from coastcross pasture fertilized with two nitrogen sources. In: **INTERNATIONAL GRASSLAND CONGRESS**, 19, São Pedro-SP, Brazil, 2001. Proceedings. Piracicaba: FEALQ, 2001a. p.190-192.

CANTARELLA, H.; CORRÊA, L.A.; PRIMAVESI, A.C.; PRIMAVESI, O.; FREIRAS, A.R.; SILVA, A.G. Perdas diárias de amônia por volatilização, de duas fontes de adubo nitrogenado aplicadas na superfície de pastagem de capim Coastcross (*Cynodon dactylon* cv. Coastcross). **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**. 38.M Piracicaba, 2001. Anais. Brasília, Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001b. p. 330-331.

CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A.; GALLO, P.B.; BOLONHEZI, D.; ROSSETTO, R.; MARTINS, A.L.M.; PAULINO, V.T.; ALCÂNTARA, P.. Ammonia losses of NBPT-treated urea under Brazilian soil conditions. In: International Fertilizer Association INTERNATIONAL WORKSHOP ON ENHANCED-EFFICIENCY FERTILIZERS, 2005, Frankfurt, Alemanha. IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers. Paris, França: International Fertilizer Industry Association, 2005. v. 1. (CDRom).

CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.) **Fertilidade do solo**. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. P. 375-470.

ÇELİK, H.; KATKAT, A.V.; ASIK, B.B.; TURAN, M.A. Effect of foliar-applied humic acid to dry weight and mineral nutrient uptake of maize under calcareous soil conditions. **Communications Soil Science Plant Analysis**, New York, v. 42, p. 29-38, 2010.

CHAPERON, S.; SAUVÉ, S. Toxicity interaction of metals (Ag, Cu, Hg, Zn) to urease and dehydrogenase activities in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, 39(9):2329-2338, 2007.

CHEN, Y.; AVIAD, T. Effects of humic substances on plant growth. In: MAC-CARTHY, P.; MALCOM, R.E.; CLAPP, C.E.; BLOOM, P.R. editors. **Humic substances in soil and crop science: selected readings**. Madison: Americal Society of Agronomy and Soil Science Society of America; 1990. p. 161-87.

CHEN, D., SUTER, H., ISLAM, A., EDIS, R., FRENEY, J.R., WALKER, C.N. Prospects of improving efficiency of fertiliser nitrogen in Australian agriculture: a review of enhanced efficiency fertilisers. **Australian Journal of Soil Research**. 46, 289-301, 2008.

CHEN, Y., CLAPP, C.E., MAGEN, H. Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organo-iron complexes. **Soil Science and Plant Nutrition**. 50, 1089-1095. 2004a.

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

CHENG, N.C. **Eficiência de uso do nitrogênio (^{15}N) pelo milho a partir da aplicação superficial de ureia tratada com boro e cobre.** Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2018

CHOI, W.J.; LEE, S.M.; RO, H.M.; KIM, K.C.; YOO, S.H. Natural ^{15}N abundance of maize and soil amended with urea and composted pig manure. **Plant and Soil**, The Hague, v. 245, n.2, p. 223-232, 2002.

CHRISTENSEN, B.T. Carbon in primary and secondary organo-mineral complexes. In: CARTER, M.; STEWART, B.A. (Ed.). **Structure and organic matter storage in agricultural soil.** (Advances in Soil Sciences). Boca Raton: CRC, p. 97-165. 1996.

CLARCKSON, D.T.; HANSON, J.B. The mineral nutrition of higher plants. Annual Review of **Plant Physiology**, Palo Alto, v.3, p.239-298, 1980.

COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E. de; BAHIA FILHO, A.F.C.; GUEDES, G.A.A. Balanço de nitrogênio (^{15}N) em um Latossolo Vermelho escuro, sob vegetação de cerrado, cultivado com milho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.15, n.2, p.187-93, 1991.

COELHO, A.M.; FRANÇA, G.E. de; BAHIA FILHO, A.F.C.; GUEDES, G.A.A. Doses e métodos de aplicação de fertilizantes nitrogenados na cultura do milho sob irrigação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.16, n.2, p.61-7, 1992.

COELHO, A. M., FRANÇA, G. E., PITTA, G. V. E., ALVES, V. M. C. E HERNANI, L. C. 2006. **Nutrição e adubação do milho.** Sete Lagoas: Embrapa.

COSTA, M.C.G.; VITTI, G.C.; CANTARELLA, H. Volatilização de N-NH_3 de fontes nitrogenadas em cana-de-açúcar colhida sem despalha a fogo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, p. 631-637, 2003.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Observatório Agrícola. **Acompanhamento da safra brasileira – grãos.** V.4, Safra 2016/2017 – N.9 – Nono levantamento, Junho, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/17_06_08_09_02_48_boletim_graos_junho_2017.pdf>. Acesso em: 26 de junho de 2017.

CRAWFORD, J.H., T.L. SENN, AND G.E. STEMBRIDGE. 1969. The influence of humic acid fractions on sprout production and yield of the carogold sweet potato. South Carolina Agr. Expt. Sta. Tech. Bul. 1029:1–16.

DE DATTA, S.K. **Principles and practices of rice production**. New York: John Wiley, 1981. 618p.

DAVIDSON, D., GU, F.X. Materials for sustained and controlled release of nutrients and molecules to support plant growth. **Journal of Agricultura and Food Chemistry**. 60, 870–876, 2012.

DELWICHE, C.C.; STEYN, P.L. Nitrogen isotope fractionation in soils and microbial reactions. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.4, n.11, p. 929-935, 1970.

de SANTIAGO, A., EXPOSITO, A., QUINTERO, J.M., CARMONA, E., DELGADO, A., Adverse effects of humic substances from different origin on lupin as related to iron sources. **Journal of Plant Nutrition**. 33, 143–156, 2010.

DICK, D.P.; NOVOTNY, E.H.; DIECKOW, J.; BAYER, C. Química da matéria orgânica do solo. In: SINESI, N.; XING, B.; HUANG, P.M. (Org.). **Química e mineralogia do solo: aplicações**. Viçosa: SBCS, v. 2, p.2. 2009.

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

DOBERMANN, A. Nutrient use efficiency measurement and management. In: INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION. **Fertilizer best management practices**: general principles, strategy for their adoption and voluntary initiatives vs regulations. Paris, 2007, chap. 1, p. 1 – 28.

DOMINGUEZ, M. J.; SANMARTIN, C.; FONT, M.; PALOP, J.; SAN FRANCISCO, S.; URRUTIA, O.; HOUDUSSE, F.; GARCÍA-MINA, J. M. Design, synthesis and biological evaluation of phosphoramidate derivatives as urease inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 56, p. 3721-3731, 2008.

DONG, L., CORDOVA-KREYLOS, A.L., YANG, J., YUAN, H., SCOW, K.M., Humic acids buffer the effects of urea on soil ammonia oxidizers and potential nitrification. **Soil Biology and Biochemistry**. 41, 1612–1621, 2009.

DUETE, R. R. C.; MURAOKA, T.; SILVA, E. C.; TRIVELIN, P. C. O.; AMBROSANO, E. J.. Manejo da adubação nitrogenada e utilização do nitrogênio (^{15}N) pelo milho em Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.161-171, 2008.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Manual de Métodos de Análise de solo**. 2 ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

EMBRAPA, Avaliação de sistemas de produção de milho na região de Sete Lagoas, MG. Circular Técnica. ISSN 1518-4269. Sete Lagoas, MG Dezembro, 2009.

EMBRAPA. **Milho: o produtor pergunta a Embrapa responde**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 338 p.

EMBRAPA. **Cultivo do milho: Ecofisiologia**. Embrapa Milho e Sorgo. Sistema de Produção 1. ISSN 1679-012X Versão Eletrônica – 8ª Edição Out de 2011a. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/ecofisiologia.htm>. Acesso em 3 jul. 2017.

EMBRAPA, Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. 3 ed. Brasília: EMBRAPA Produção de informação; Rio de Janeiro: EMBRAPA Solos, 2013. 353p.

ENCYCLOPEDIA OF SOIL SCIENCE. New York: Rattan Lal, v. 1, 2006.

ENGEL, R.; JONES, C.; WALLANDER, R. Ammonia volatilization from urea and mitigation by NBPT following surface application to cold soils. **Nutrient Management and Soil and Plant Analysis**, v. 75, p. 2348-2357, 2011.

ENGEL, R.E., E. WILLIAMS, R. WALLANDER, AND J. HILMER. Apparent persistence of N-(n-butyl) thiophosphoric triamide is greater in alkaline soils. **Soil Science Society American Journal**. 77:1424–1429. 2013. doi:10.2136/sssaj2012.0380.

ENGEL, R.E., B.D. TOWEY, AND E. GRAVENS. Degradation of the urease inhibitor NBPT as affected by soil pH. **Soil Science Society American Journal**. 79:1674–1683. 2015. doi:10.2136/sssaj2015.05.0169.

ERISMAN, J.W.; SUTTON, M.A.; GALLOWAY, J.; KLIMONT, Z.; WINIWARTER, W. How a century of ammonia synthesis changed the world. **Nature Geoscience**, n.1, p. 6336-639, 2008.

ERNANI, P.R.; SANGOI, L.; RAMPAZZO, C. Lixiviação e Imobilização de nitrogênio num Nitossolo como variáveis da forma de aplicação da uréia e da palha de aveia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.26, n.4, p.993-1000, 2002.

ERNST, J.W. & MASSEY, H.F. The effects of several factors on volatilization of ammonia formed from urea in soils. *Soil Science of America Procedure*. 24:87-90, 1960.

ERRO, J., URRUTIA, O., FRANCISCO, S.S., GARCIA-MINA, J.M. Development and agronomical validation of new fertilizer compositions of high bioavailability and reduced potential nutrient losses. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 55, 7831–7839, 2007.

ERRO, J., URRUTIA, O., BAIGORRI, R.; FUENTES, M.; ZAMARREÑO, A.M.; GARCIA-MINA, J.M. Incorporation of humic-derived active molecules into compound NPK granulated fertilizers: main technical difficulties and potential solutions. **Chemical and Biological Technologies in Agriculture**. December 2016, 3:18.

ESPINDULA, M.C., V.S. ROCHA, M.A. SOUZA, M. CAPANHARO, AND G.S. PAULA. Rates of urea with or without urease inhibitor for topdressing wheat. **Chil. J. Agric. Res.** 73:160–167. 2013.

FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. Enfoque fisiológico da nutrição e adubação do milho. In: FANCELLI, A. L.; DOURADO-NETO, D. **Milho: fatores determinantes da produtividade**. Piracicaba: ESALQ: USP, 2007. p. 137-183.

FANCELLI, L.; DOURADO NETO. **Milho: manejo e produtividade**. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2009, 185 p.

FANCELLI, A.L. **Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes: culturas**; v.3 anais.../ed. Luís Inácio Prochnow, Valter Casarin e Silvia Regina Stipp. Piracicaba: IPNI, p. 43-89, 2010.

FARIA, L. de A. **Dinâmica do nitrogênio proveniente de ureia combinada a tecnologias redutoras de volatilização**. 2013. 102 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FARIA, L. de A; NASCIMENTO, C.A.C. do; VITTI, G.C.; LUZ, P.H. de C.; GUEDES, E.M.S. Loss of ammonia from nitrogen fertilizers applied to maize and soybean straw **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.37, p.969-975, 2013.

FERNANDES, F. C. S.; BUZETTI, S.; ARF, O.; ANDRADE, J. A. C. Doses, eficiência e uso de nitrogênio por seis cultivares de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.4, n.2, p.195-204. 2005.

FERNANDES, M.S.; SOUZA, S.R. Absorção de nutrientes. In: FERNANDES, M.S. (Ed.). **Nutrição mineral de plantas**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. v.1, p. 115-152.

FERREIRA, A. C. B.; ARAÚJO, G. A. A.; PEREIRA, P. R. G. P.; CARDOSO, A. A. 2001. Características agrônomicas e nutricionais do milho adubado com nitrogênio, molibdênio e zinco. **Scientia Agricola**, v.58, n.1, p.131-138.

FITTER, A. H. Characteristics and functions of root systems. In: WEISEL, Y.; ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant roots: the hidden half**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 15-32.

FORNASIERI FILHO, D. **Manual da cultura do milho**. Jaboticabal: Funep, 2007. 576 p.

FRENEY, J.R.; LEUNING, R.; SIMPSON, J.R.; DENMEAD, O.T. & MUIRHEAD, W.A. Estimating ammonia volatilization from flooded rice fields by simplified methods. **Soil Science Society of America Journal**, 49:1049-1054, 1985.

FU, L. et al. Effects of copper pollution on the activity of soil invertase and urease in loquat orchards. **Chinese Journal of Geochemistry**, 28(1):76-80, 2009.

GARCIA, P.L. **Eficiência da adubação com misturas de ureia comercial e ureia recoberta com enxofre e polímero na semeadura do milho**. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

GARCIA, A.C., SANTOS, L.A., IZQUIERDO, F.G., SPERANDIOA, M.V.L., CASTRO, R.N., BERBARA, R.L.L. Vermicompost humic acids as an ecological pathway to protect rice plant against oxidative stress. **Ecological Engineering**. 47, 203–208, 2012.

GARCIA-MINA, J.M. Fertilizantes complejos órgano-minerales. In: JUAREZ, M.; SANCHEZ-ANDREU, J.; editors. **Fosforo en agricultura**. Alicante: Universidad de Alicante; 1992. p. 129–35.

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

GARCIA-SERNA, J., JUAREZ, M., JORDA, J., SANCHEZANDREU, J. Influence of organic compounds on nitrogen-fertilizer solubilization. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. 27, 2485–2491, 1996.

GAVA, G.J.C. **Compartimentalização do nitrogênio no sistema solo-planta na implantação da semeadura direta do ciclo da cultura do milho**. 2003. 125 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

GEE, G.W.; BAUDER, J.M. Particle-size analysis. In: KLUTE, A. (Ed.) **Methods of soil analysis**. 2nd ed. Madison: ASA; SSSA. pt. 1: Physical and mineralogical methods (Agronomy Series, 9), p 383-411. 1986.

GINÉ, M.F.; BERGAMIN FILHO, H.; ZAGATTO, E.A.G.; REIS, B.F. Simultaneous determination of nitrate and nitrite by flows injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, New York, v. 114, p. 191 – 197, 1980.

GROHS, M.; MARCHESAN, E.; SANTOS, D.S.; MASSONI, P.F.S.; SARTORI, G.M.S.; FERREIRA, R.B. Resposta do arroz irrigado ao uso de inibidor de urease em plantio direto e convencional. **Ciência e Agrotecnologia**, 35:336-345, 2011.

GROVE, L.T. **Nitrogen fertility in oxisols and ultisols of the humid tropics**. New York: Cornell University, 1979. 27p. (Cornell International Agricultural Bulletin, 36.

GROVE, L.T.; RITCHEY, K.D.; NADERMAN JR., G.C. Nitrogen fertilization of maize on oxisol of the cerrado of Brasil. **Agronomy Journal**, Madison, v.27, n.2, p.261-5, 1980.

GUELF, D. **Fertilizantes nitrogenados estabilizados, de liberação lenta ou controlada.** International Plant Nutrition Institute – IPNI, Informações Agronômicas nº 157, mar. 2017.

GOES, R.J.; RODRIGUES, R.A.F.; ARF, O.; VILELA, R.G. Nitrogênio em cobertura para o milho (*Zea mays* L.) em sistema plantio direto na safrinha. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.11, p. 169-177, 2002.

GOES, R.J.; RODRIGUES, R.A.F.; TAKASU, A.T.; ARF, O. Características agronômicas e produtividade do milho sob fontes e doses de nitrogênio em cobertura no inverno. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. Sete Lagoas, v.12, p. 250 – 259, 2013.

GOMES, R.F.; SILVA, A.G.; ASSIS, R.L.; PIRES, F.R. Efeito de doses e da época de aplicação de nitrogênio nos caracteres agronômicas da cultura do milho sob plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v.31, p. 931-938, 2007.

GONZÁLEZ VILLALBA, H.A. **Misturas de ureia revestida com polímero e ureia convencional na adubação da cultura do milho.** 2014. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

HALL, W. Benefits of enhanced-efficiency fertilizers for the environment. In: **IFA International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers**. June 28-30. Frankfurt, Germany. 10 pp. 2005.

HALPERN, M.; BAR-TAL, A.; OFEK, M.; MINZ, D.; MULLER, T.; YERMIYAHU, U. The use of bioestimulantes for enhancing nutrient uptake. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 130, p. 141-174, 2014.

HARGROVE, W.I. Soil environmental and management factors influencing ammonia volatilization under field conditions. In: BOCK, B.R.; KISSEL, D.E. (Ed). **Ammonia volatilization from urea fertilizers**. Alabama; NFDC, TVA, 1988. cap.2 p.17-36.

HARPER, J.E. Nitrogen metabolism. In: BOOTE, K.J., BENNETT. J.M., SINCLAIR, T.R., et al. **Physiology and determination of crop yield**. Madison : ASA/CSSA/SSSA, 1994. Chapt.11A. p.285-302.

HARPER, L.H.; SHARPE, R.R. Nitrogen dynamics in irrigated corn: soil-plant nitrogen and atmospheric ammonia transport. **Agronomy Journal**, v.87, p.669-675, 1995.

HARTZ, T.K., BOTTOMS, T.G. Humic substances generally ineffective in improving vegetable crop nutrient uptake or productivity. **Hortscience** 45, 906–910, 2010.

HERINGER, D. D. **Produto fertilizante a base de ureia e processo para fabricação do produto**. Pi 0700921-6 a. 2008. 10 p.

IMBUFE, A.U.; PATTI, A.F.; BURROW, D.; SURAPANEMI, A.; JACKSON, W.R.; MILNER, A.D. Effects of potassium humate on aggregate stability of two soils from Victoria, Australia. **Geoderma**. v. 125, p. 321-330, 2005.

INTERNATIONAL FERTILIZER INDUSTRY ASSOCIATION - IFA (Paris, França). Fertilizer consumption 2014. Disponível em: <www.fertilizer.org>. Acesso em: 07 jul de 2017.

INTERNATIONAL FERTILIZER DEVELOPMENT CENTER - IFDC. **Manual for Determining Physical Properties of Fertilizer**. Alabama. 1986. 88 p.

INTERNATIONAL HUMIC SUBSTANCES SOCIETY - IHSS. Disponível em: <<http://www.humicsubstances.org/>>. Acesso em: 3 out. 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 16387**: soil quality: effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) Determination of effects on reproduction and survival. Genebra, 2003.

KASIM, S., AHMED, O.H., MAJID, N.M.A., YUSOP, M.K., JALLOH, M.B. Reduction of ammonia loss by mixing urea with liquid humic and fulvic acids isolated from tropical peat soil. **American Journal of Agriculture and Biological Science**. 4, 18–23, 2009.

KHAN, S.U.; SCHNITZER, M. The retention of hydrophobic organic compounds by humic acid. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v.36, p.745-754, 1972.

KRAJEWSKA, B.; BRINDELL, M. Thermodynamic study of competitive inhibitors' binding to urease. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 123, Issue 3, p. 2427–2439, 2016.

KINIRY, J.R.; BONHOMME, R. **Predicting maize phenology**. In: HODGES, T. Predicting crop phenology. Boca Raton : CRC, 1991. Cap.11, p.115-132.

KIRAN, J.K., KHANIF, Y.M., AMMINUDDIN, H., ANUAR, A.R. Effects of controlled release urea on the yield and nitrogen nutrition of flooded rice. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**. 41, 811–819, 2010.

KISS, S.; SIMIHĂIAN, M. Inorganic compounds tested for evaluation of their inhibiting effect on soil urease activity, urea hydrolysis, ammonia volatilization, and nitrous oxide emission. In: **Improving efficiency of urea fertilizer by inhibition of soil urease activity**. The Netherlands. Klumer Academic Publishers, 2002, cap. 1, p. -42.

KIEHL, J.C. Distribuição e retenção da amônia no solo após aplicação de uréia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 13:75-80, 1989.

KOELLIKER, J.K. & KISSEL, D.E. Chemical equilibria affecting ammonia volatilization. In: BOCK, B.R. & KISSEL, D.E., eds. **Ammonia volatilization from urea fertilizers**. Alabama, National Fertilizer Development Center, 1988. p.37-52.

KOLLN, O.T. **Interação entre os estresses de nitrogênio e disponibilidade hídrica no fracionamento isotópico de ^{13}C e na produtividade em soqueira de cana-de-açúcar**. 2012. 102p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2012.

KRAJEWSKA, B.; BRINDELL, M. Thermodynamic study of competitive inhibitors' binding to urease. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 123, Issue 3, p. 2427–2439, 2016.

LAL, R. Soil carbon sequestration impacts on global climate change and food security. **Science** v. 304, p.1623-1627, 2004.

LANGE, A.; LARA CABEZAS, W.A.; TRIVELIN, P.C.O. Produtividade de palha e de milho no sistema semeadura direta em função da época de aplicação do nitrogênio no milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.8, p. 57-68, 2009.

LATCOVIC, D.; JACIMOVIC, G.; MALESEVIC, M.; MARINKOVIC, B.; CRNOBARAC, J. Corn monoculture yield response to fertilization and nitrate nitrogen distribution. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, London, v.43, p.1015-1023, 2012.

LARA CABEZAS, W.A.R.; KORNDORFER, G.H.; MOTTA, S.A. Volatilização de N-NH₃ na cultura de milho: I Efeito da irrigação e substituição parcial da UR por sulfato de amônio. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 481-487, 1997.

LARA CABEZAS, W.A.R. et al. Volatilização de NH₃ na cultura de milho: II. Avaliação de fontes sólidas e fluídas em sistema de plantio direto e convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.489-496, 1997.

LARA CABEZAS, W.A.R.; TRIVELIN, P.C.O.; KORNDÖRFER, G.H.; PEREIRA, S. Balanço da adubação nitrogenada sólida e fluida de cobertura na cultura do milho em sistema plantio direto no Triângulo Mineiro (MG). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.24, p.363-376, 2000.

LARA CABEZAS, W.A.R.; SOUZA, M.A. Volatilização de amônia, lixiviação de nitrogênio e produtividade de milho em resposta à aplicação de misturas de ureia com sulfato de amônio ou com gesso agrícola. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2331-2342, 2008.

LAWLESS, J.R., H.D. SUNDERMAN, F.L. LAMM, AND L.D. ROBERTSON. 1984. Report of Research Results, Supplement 1. In: Compendium of research reports on use of non-traditional materials for crop production. NCR-103 Committee. Coop. Ext. Serv. Iowa State Univ.

LAZZARINI, P.R.C. **Substâncias húmicas extraídas de turfa associadas com N-UR: influência no crescimento da cana-de-açúcar e nas transformações do N no solo**. 2014. 82p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

LEITE, J.M. **Eficiência agronômica da adubação nitrogenada associada à aplicação de substâncias húmicas em cana-de-açúcar**. 2016. 132 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

LEMAIRE, G.; GASTAL, F. **N uptake and distribution in plant canopies**. In: Diagnosis of the nitrogen status in crops. Paris : INRA, 1997. p. 3-43.

LI, B.; McKEAND, S.E.; ALLEN, H.L. Genetic variation in nitrogen use efficiency of loblolly pine seedlings. **Forest Science**, Madison, v. 37, p. 613 – 626, 1991.

LIJUN, F.; YANG, W.; YANGYE, W. Effects of copper pollution on the activity of soil invertase and urease in loquat orchards. **Chinese Journal of Geochemistry**, v. 28, p. 76-80, 2009.

LINKOHR, B. I. et al. Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of arabidopsis. **Plant Journal**, v. 29, n.6, p. 751-760, 2002.

LIU, Y.Y., SWINTON, S.M., MILLER, N.R. Is site-specific yield response consistent over time? Does it pay? **American Journal of Agricultural Economics**. 88, 471–483, 2006.

LIU, W. Correlation between specific fine root and mycorrhizal colonization of maize in different soil type. **Frontiers of Agriculture in China**, Xangai, v.3, p. 13-15, 2009.

LOFFREDO, E., BERLOCO, M., SENESI, N. The role of humic fractions from soil and compost in controlling the growth in vitro of phytopathogenic and antagonistic soil-borne fungi. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 69, 350–357, 2008.

MacCARTHY, P. The principles of humic substance: and introduction to the first principle. In: Ghabbour, E.A., Davis, G. (Eds.), **Humic substances – Structures, Models, and Functions**. Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 19-30, 2001.

MAGALHÃES, P. C. SOUZA, T.C. de; ALBUQUERQUE, P.E.P. de; KARAM, D.; MAGALHÃES, M.M.; CANTAO, F.R. de O. Caracterização ecofisiológica de linhagens de milho submetidas a baixa disponibilidade hídrica durante o florescimento. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo** (Impresso), v. 8, p. 223-232, 2009.

MALAVOLTA, E. **Elementos de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Ceres, 1980. 251p.

MALAVOLTA, E.; DANTAS, J.P. Nutrição e adubação de milho. In: PATERNIANE, E.; VIEGAS, G.P. (Eds.) **Melhoramento e produção de milho**. 2.ed. Campinas: Fundação Cargill,. v.2, p.539-5931, 1987.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638p.

MANUNZA, B., DEYANA, S., PINTORE, M., GESSA, C. The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(n-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p. 789-796, 1999.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes e corretivos**. Brasília. 2013. 150 p.

MAR, G. D.; MARCHETTI, M. E.; SOUZA, L. C. F. de; GONÇALVES, M. C.; NOVELINO, J. O. Produção do milho safrinha em função de doses e épocas de aplicação de nitrogênio. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 2, p. 267-274, 2003.

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

MARTIKAINEN, P.J. Nitrification in forest soil of different pH as affected by urea, ammonium sulphate and potassium sulphate. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.17, p. 363-367, 1985.

MATTOS JUNIOR, D.; CANTARELLA, H.; RAIJ, B. van. Manuseio e conservação de amostras de solo para preservação do N inorgânico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v.19, p. 423-431, 1995.

MIKKELSEN, R.L. Biuret in urea fertilizer. **Fertilizer Research**, v.26, p.311-318, 1990.

MINOLTA, CAMERA. **Manual for chlorophyll meter SPAD-502**. Osaka: 1989. 22 p.

MORA, V.; OLAETXEA, M.; BACAICOA, E.; BAIGORRI, R.; FUENTES, M.; ZAMARRERREÑO, AM.; GARCIA-MINA, JM. Abiotic stress tolerance in plants: exploring the role of nitric oxide and humic substances. In: KHAN, N.M.; MOBIN, M.; FIROZ, M.; CORPAS, FJ.; editors. **Nitric oxide in plants: metabolism and role in stress physiology**. Berlin: Springer; 2014. p. 243-64.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA. 626p. 2002.

MOREIRA, L.A. **Ureia estabilizada na adubação nitrogenada de cana-de-açúcar**. 2016. 64p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2016.

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

MUSCOLO, A.; SIDARI, M.; NARDI, S. Humic substance: relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. **Journal Geochemical Exploration**, Amsterdam, v. 129, p. 57-63. 2013.

NASCIMENTO, C.A.C.; VITTI, G.C.; FARIA, L.A., LUZ, P.H.C.; MENDES, F.L. Ammonia volatilization from coated urea forms. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 37, p. 1057-1063, 2013.

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

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

NELSON, D.W. Gaseous losses of nitrogen other than through denitrification. In: STEVENSON, F.J. (Ed.). Nitrogen in agricultural soils. Madison, **American Society of Agronomy**, p.327-363, 1982.

NEMEC, S. AND O. LEE. 1992. Effects of preplant deep tillage of soil amendments on soil mineral analysis, citrus growth, production and tree health. **Soil and Tillage Res.** 23:317–331.

NEYMAN, G. B.; DERR, E. A. **Homogeneous granules of slow-release fertilizer and method of making the same**. United States Patent Office, 2002. (US Patent nº 6464746).

NOVAIS, R.F.; NEVES, J.C.L.; BARROS, N.F. Ensaio em ambiente controlado. In: OLIVEIRA, A.J.; GARRIDO, W.S.; ARAÚJO, J.D.; LOURENÇO, S. (Coord.). **Métodos de pesquisa em fertilidade do solo**. Brasília: EMBRAPA, SEA, p. 189-253, 1991.

NOVOTNY, E.H.; BLUM, W.E.H.; GERZABEK, M.H.; MANGRICH, A.S. Soil management system effects on size fractioned humic substances. **Geoderma**. v. 92, p. 87-109, 1999.

OVERREIN, L.N. & MOE, P.G. Factors affecting urea hydrolysis and ammonia volatilization in soil. **Soil Science Society of America Procedure.**, 31:57-61, 1967.

PAULSON, K.N.; KURTZ, L.T. Locus of urease activity in soil. **Soil Science Society of American Procedure**, Madison, v.33, p. 897-901, 1969.

PEIRIS, D.; PATTI, A.F.; JACKSON, W.R.; MARSHALL, M.; SMITH, C.J. The use of Ca-modified, brown-coal-derived humates and fulvates for treatments of soil acidity. **Australian Journal of Soil Research**. v. 40, p. 1171-1186, 2002.

PERTUSATTI, J.; PRADO, A.G.S. Buffer capacity of humic acid: thermodynamic approach: **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 314, p. 484-489, 2007.

PETTIT, N.M.; SMITH, A.R.J.; FREEDMAN, R.B.; BURNS, R.G. Soil urease: Activity, stability, and kinetic properties. **Soil Biology & Biochemistry**. 8:479-484, 1976.

PETTIT, R.E. Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid and humin: their importance in soil fertility and plant health. **CTI Research**, 2004.

PFLUGMACHER, S., PIETSCH, C., RIEGER, W., STEINBERG, C.E.W. Dissolved natural organic matter (NOM) impacts photosynthetic oxygen production and electron transport in coontail *Ceratophyllum demersum*. **Science of the Total Environment**. 357, 169–175, 2006.

PICCOLO, A.; MBAGWU, J.S.C. Effects of humic substances and surfactants on the stability of soil aggregates. **Soil Science**. v. 147, p. 47-54, 1989.

PICCOLO, A., PIETRAMELLARA, G., MBAGWU, J.S.C. Use of humic substances as soil conditioners to increase aggregate stability. **Geoderma** 75, 267–277. 1997.

PICCOLO, A.; MBAGWU, J.S.C. Exogenous humic substances as conditioners for the rehabilitation of degraded soils. **Agro Food Industry Hi Tech**. v. 8, p. 2-4, 1997.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances. **Soil Science**. 166, 810-832. 2001.

PICCOLO, A. The supramolecular structure of humic substances: a novel understanding of humus chemistry and implications in soil Science. **Advances in Agronomy**, v.75, p.57-134, 2002.

PINTON, R., CESCO, S., VARANINI, Z. Role of humic substances on the rhizosphere. In: Senesi, N., Xing, B., Huang, P.M. (Eds.), **Biophysico-Chemical Processes Involving Natural Nonliving Organic Matter in Environmental Systems**. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, pp. 341–359. 2009.

POLETO, N.; GROHS, D.; MUNDSTOCK, C. Flutuação diária e estacional de nitrato e amônio em um argissolo vermelho distrófico típico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, p. 1619-1626, 2008.

PONCIANO, N. J.; SOUZA, P. M. DE; REZENDE, A. M. Entraves da comercialização à competitividade do milho brasileiro. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, n. 104, p. 23-40, 2003.

PORTUGAL, A. F.; JUCKSCH, I.; SCHAEFER, C. E. G. R.; WENDLING, B. A. Determinação de estoques totais de carbono e nitrogênio e suas frações em sistemas agrícolas implantados em Argissolo Vermelho-Amarelo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p.2091-2100, 2008.

PRIMO, D.C.; MENEZES, R.S.C.; da SILVA, T.O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**. Vol. 7, Num 5. 2011.

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

QUILTY, J.R., CATTLE, S.R., Use and understanding of organic amendments in Australian agriculture: a review. **Soil Research**. 49, 1–26. 2011.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

RAIJ, B. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**. Piracicaba: IPNI Brasil, 2011.

RAWLUK, C.D.L.; GRANT, C.A.; RACZ, G.J. Ammonia volatilization from soils fertilized with urea and varying rates of urease inhibitor NBPT. **Canadian Journal of Soil Science**. v. 81(2), p. 239-246, 2001.

RECH, I.; POLIDORO, J. C.; PAVINATO, P. S.; Additives incorporated into urea to reduce nitrogen losses after application to the soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 52, n. 3, p. 194-204, Mar. 2017.

RECOUS, S.; MARY, B.; FAURIE, G. Microbial immobilization of ammonium and nitrate in cultivated soils. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 913-922, 1990.

REEZA, A.A., AHMED, O.H., NIK MUHAMAD, N.A.M., JALLOHN, M.B., 2009. Reducing ammonia loss from urea by mixing with humic and fulvic acids isolated from coal. **Am. J. Environ. Sci.** 5, 420–426.

REIS, B.F.; VIEIRA, J.A.; KRUG, F.J.; GINÉ, M.F. Development of a flow injections system two analytical paths for ammonium determination in soil extracts by conductometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.8, p. 523-528, 1997.

RENNIE, D.A.; PAUL, E.A.; JOHNS, L.E.; Natural nitrogen-15 abundance of soil and plant samples. **Canadian Journal of Soil Science**. Manitoba, v.56, n.1, p. 43-50, 1976.

RENNIE, R.J. Comparison of methods of enriching a soil with nitrogen-15 to estimate dinitrogen fixation by isotope dilution. **Agronomy Journal**, Madison, v.78, p. 115-163, 1986.

RESENDE, M.; CURI, N., REZENDE, S.B.; CORRÊA, G. F. **Pedologia: Base para distinção de ambientes**. Lavras: UFLA, 322p. 2007.

RITCHIE, S.; HANWAY, J. J. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University of Science and Technology; Cooperative Extension Service, 1989.

RITCHIE, S.W.; HANWAY, J.J.; BENSON, G.O. **How a corn plant develops**. Ames: Iowa State University, 1993, 92 p.

ROBINSON, D.; HANDLEY, L.L. SCRIMGEOUR, C.M. A theory for $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ fractionation in nitrate-grown vascular plants. **Planta**, Berlin, v. 205, n. 3, p. 397-406, 1998.

ROBINSON, D. $\delta^{15}\text{N}$ as an integrator of the nitrogen cycle. **Trends in Ecology & Evolution**, Amsterdam, v. 16, n.3, p. 153-162, 2001.

ROCHETTE, P.; ANGERS, D.A.; CHANTIGNY, M.H.; MACDONALD, D.; BISSONNETTE, N. & BERTRAND, N. Ammonia volatilization following surface application of urea to tilled and no-till soils: A laboratory comparison. **Soil Tillage Res.**, 103:310-315, 2009.

RODRIGUES, M.B.; KIEHL, J.C. Volatilização de amônia após emprego de uréia em diferentes doses e modos de aplicação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.10, p.37-43, 1986.

RODRIGUES, M.B.; KIEHL, J.C. Distribuição e nitrificação da amônia proveniente da uréia aplicada ao solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.16, p.403-408, 1992.

ROSE, M.T.; PATTI, A.F.; LITTLE, K.R.; BROWN, A.L.; JACKSON, W.R.; CAVAGNARO, T.R. A meta-analysis and review of plant-growth responses to humic substances: practical implications for agriculture. **Advances in Agronomy**, San Diego, v. 124, p. 37-89, 2014.

ROSOLEM, C.A.; GIOMMO, J.S.; LAURENTI, R.L.B. Crescimento e nutrição de cultivares de algodoeiro em resposta à calagem. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, p. 827-833, 2000.

ROWBERRY, R.G. AND G.H. COLLIN. 1977. The effects of humic acid derivatives on the yield and quality of Kennebec and Sebago potatoes. **Amer. Pot. J.** 54:607–609.

RUSSELL, L., STOKES, A.R., MACDONALD, H., MUSCOLO, A., NARDI, S. Stomatal responses to humic substances and auxin are sensitive to inhibitors of phospholipase A(2). **Plant Soil** 283, 175–185, 2006.

SANCHEZ-DIAZ, M.; GARCIA-MINA, J.M. Effet de l'association chimique NPK MGcomplexe organique activé sur le development vegetal et l'assimilation de nutriments pour les plantes. **Inab-Rapp.** 1994;72:1–7.

SANGOI, L.; ERNANI, P.R.; SILVA, P.R.F. Maize response to nitrogen fertilization timing in two tillage systems in a soil with high organic matter content. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** Viçosa, v.31, p. 507-517, 2007.

SANTOS, J.G.P. **Disponibilidade de nitrogênio para o milho em Latossolo Vermelho.** 2008. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

SANZ-COBENA, A., L. SANCHEZ-MARTIN, L. GARCIA-TORRES, AND A. VALLEJO. Gaseous emissions of N₂O and NO and NO₃ – leaching from urea applied with urease and nitrification inhibitors to a maize (Zea mays) crop. **Agric. Ecosyst. Environ.** 149:64–73. 2012.

SARGENTINI JÚNIOR, E.; ROCHA, J.C.; ROSA, A.H.; ZARA, L.F.; SANTOS, A. Substâncias húmicas aquáticas: fracionamento molecular e caracterização de rearranjos internos após a complexação com íons metálicos. **Química Nova**, v.24, p. 339-344, 2001.

SAS Institute. SAS system for Window. v.9.3. **SAS Institute Inc.**, Cary, NC, 2011.

SCHACHTMAN, D. P.; REID, R. J.; AYLING, S. M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 2, p. 147-153, Feb. 1998.

SCHONINGER, E.L. **Absorção foliar de amônia e produtividade do milho em função da época de aplicação de ureia em cobertura.** 2014. 96p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Piracicaba, 2014.

SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M.A. A state of the art structural concept for humic substances. **Naturwissenschaften**, Berlin, v. 80, p. 29-30 1993.

SCHULTEN, H.R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, v. 162, p. 115-130, 1997.

SENESI, N. The fractal approach to the study of humic substances. In: SENESI, N., MIANO, T.M. (Eds.), **Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health. Proceedings of the 6th International Meeting of the International Humic Substances Society**. IHSS, Bari, Italy, pp. 3–41, 1994.

SHAVIV, A. 2005: Controlled Release Fertilizers. IFA **International Workshop on Enhanced-Efficiency Fertilizers**, Frankfurt. International Fertilizer Industry Association Paris, France.

SHAW, W.H.R. The inhibition of urease by various metal Ions. **Journal of America Chemical Society**. v. 76, p. 2160 – 2163, 1954.

SHEPHERD, T.G.; SAGGAR, S.; NEWMAN, R.H.; ROSS, C.W.; DANDO, J.L.; Tillage-induced changes to soil structure and organic carbon fractions in New Zealand soils. **Australian Journal of Soil Research**. v. 39, p. 465-489, 2001.

SHOEMAKER, H.E.; McLEAN, E.O.; PRATT, P.F. Buffer methods for determining lime requirement of soils with appreciable amounts of extractable aluminium. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.25, p. 274-277, 1961.

SIDDIQI, M.Y.; GLASS, A.D.M. Utilization index: a modified approach to the estimation and comparison of nutrient utilization efficiency in plants. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v.4, p. 289 – 302, 1981.

SILVA, A. L. **Eficiência agronômica da ureia estabilizada com inibidores de urease e nitrificação na cultura do milho**. 2016. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

SILVA, I.R.; MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ, V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.F.; CANARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, p. 374-470, 2007.

SILVA, A.C.; ROSADO, S. C. S.; CALEGARIO, N.; RODRIGUES, E. A. C.; OLIVEIRA, A. N.; VIEIRA, C. T. Variações genéticas na qualidade do sistema radicular de mudas de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 4, p. 609-617, 2007b.

SILVA, A. G. B.; SEQUEIRA, C. H.; SERMARINI, R. A.; OTTO, R. Urease inhibitor NBPT on ammonia volatilization and crop productivity: a meta-analysis. **Agronomy Journal**, n. 109, p. 1-13, 2017.

SIMPSON, A. J., KINGERY, W. L., HAYES, M. H., SPRAUL, M., HUMPFER, E., DVORTSAK, P., KERSSEBAUM, R.; GODEJOHANN, M. & HOFMANN, M. Molecular structures and associations of humic substances in the terrestrial environment. **Naturwissenschaften**, 89(2), 84-88, 2002.

SIMPSON, M.J., CHEFETZ, B., HATCHER, P.G. Phenanthrene sorption to structurally modified humic acids. **Journal of Environmental Quality**. 32, 1750–1758, 2003.

SINGH, J., A. KUNHIKRISHNAN, N.S. BOLAN, AND S. SAGGAR. Impact of urease inhibitor on ammonia and nitrous oxide emissions from temperate pasture soil cores receiving urea fertilizer and cattle urea. **Sci. Total Environ**. 465:56–63. 2013.

SLADKÝ, Z. The application of extracted humus substances to overground parts of plants. **Biologia. Plantarum**. 1, 6, 1959.

SOARES, M.R.; ALLEONI, L. R. F.; CASAGRANDE, J. C. Parâmetros termodinâmicos da reação de adsorção de boro em solos tropicais altamente intemperizados. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1014-1022, 2005.

SOARES, J.R. **Efeito de inibidores de urease e de nitrificação na volatilização de NH₃ pela aplicação superficial de ureia no solo**. 2011. 90 p. Dissertação (Mestrado em Gestão de Recursos Agroambientais) – Campinas: Instituto Agronômico, 2011.

SOARES, J.R.; CANTARELLA, H.; MENEGALE, M.L. de C. Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. **Soil Biology and Biochemistry**, v.52, p.82-89, 2012.

SOIL SURVEY STAFF. **Keys to soil taxonomy**. 12th ed. Washington: USDA; Natural Resources Conservation Service. 2014. 372 p.

SOR, K.M.; PELISSIER, J.A.; LATHAM, J.R.R. Urease inhibited urea-containing compositions. **United States Patent Office**, Detroit, v.3, p. 565-599, 1971.

SORATTO, R.P.; PEREIRA, M.; COSTA, T.A.M.; LAMPERT, V.N. Fontes alternativas e doses de nitrogênio no milho safrinha em sucessão à soja. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.41, p. 511-518, 2010.

SOUZA, L.C.F.; GONÇALVES, M.C.; ALVES SOBRINHO, T.; FEDATTO, E.; ZANON, G.D.; HASEGAWA, E.K.B. Culturas antecessoras e adubação nitrogenada na produtividade de milho em plantio direto irrigado. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, Sete Lagoas, v.2, p. 55-62, 2003.

SOUZA, T. L. **Eficiência agrônômica de fertilizantes nitrogenados, emissão de CO₂ e volatilização de NH₃ na cultura do milho**. 2015. 98 f. Dissertação (mestrado em Ciência do solo) – Universidade Federal de lavras, lavras, 2015.

SPARLING, G.P.; WHEELER, D.; VESELY, E.T.; SCHIPPER, L.A. What is soil organic matter worth? **Journal of Environmental Quality**. v. 35, p. 548-557, 2006.

STAFANATO, J. B.; GOULART, R. de S.; ZONTA, E.; LIMA, E.; MAZUR, N.; PEREIRA, C.G.; de SOUZA, H. N. Volatilização de amônia oriunda de ureia pastilhada com micronutrientes em ambiente controlado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. Viçosa, v. 37, p. 726-732, 2013.

STEVENSON, F.J. **Cycles of soil**. New York: John Wiley. 427p. 1984.

STEVENSON, F.J. **Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions**, 2nd ed.; John Wiley e Sons, Ltd: New York, 1994.

SUTTON, R., SPOSITO, G. Molecular structure in soil humic substances: the new view. **Environmental Science & Technology**. 39, 9009–9015. 2005.

SWIADER, J.M.; CHYAN, Y.; FREIJI, F.G. Genotypic differences in nitrate uptake and utilization efficiency in pumpkin hybrids. **Journal of Plant Nutrition**, New York, v. 17, p. 1687 – 1699, 1994.

SWIFT, R.S., SPARKS, D., PAGE, A., HELMKE, P., LOEPPERT, R., SOLTANPOUR, P., TABATABAI, M., JOHNSTON, C., SUMNER, M. Organic matter characterization. In: SPARKS, D.L., et al. (Ed.), **Methods of Soil Analysis**. Part 3 -Chemical Methods. Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 1011–1069, 1996.

TABATABAI, M.A. Effects of trace elements on urease activity in soils. **Soil Biology & Biochemistry**, 9:9-13, 1977.

TAN, K.H.; BINGER, A. Effect of humic-acid on aluminum toxicity in corn plants. **Soil Science**. v. 141, p. 20-25, 1986.

TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, R.; CASEY, P.; MUSTER, T.; GILL, H.; ADHIKARI, B. Enhanced efficiency fertilizers: a review of formulation and nutrient release patterns. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, p. 1131- 1142, 2014.

TISDALE, S.L.; NELSON, W.L.; BEATON, J.D. **Soil fertility and fertilizers**. New York: Macmillan, 1984. 753p.

TOMASZEWSKA, M.; JAROSIEWICZ, A.; KARAKULSKI, K. Physical and chemical characteristics of polymer coating in CRF formulation. **Desalination**. v. 146 (3), p. 19-323, 2002.

TRENKEL, M.E. Slow and controlled-release and stabilized fertilizer: an option for enhancing nutrient efficiency in agriculture. **International Fertilizer Industry Association**, Paris, France, 160p. 2010.

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

TRIVELIN, P.C.O. **Enriquecimento isotópico de ^{15}N por cromatografia de troca iônica**. 1976. 102p. Dissertação de (Mestrado em Energia Nuclear na Agricultura) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1976.

TRIVELIN, P.C.O.; LARA CABEZAS, W.A.R.; VICTORIA, R.L.; REICHARDT, K. Evaluation of a ^{15}N plot design for estimating plant recovery of fertilizer nitrogen applied to sugar cane. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v.51, p. 226-234, 1994.

TRIVELIN, P. C. O.; LARA CABEZAS, W. A. R.; BOARETO, A. E. Dinâmica do nitrogênio de fertilizantes fluidos no sistema solo-planta. In: VITTI, G. C.; BOARETO, A. E. (Ed.). **Fertilizantes fluidos**. Piracicaba: Potafos, 1994b. p. 253-268.

TRIVELIN, P. C. O.; OLIVEIRA, M. W.; VITTI, A. C.; GAVA, G. J. C.; BENDASSOLLI, J. A. Perdas do nitrogênio da ureia no sistema solo-planta em dois ciclos de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.193-201, 2002.

TRIVELIN, P.C.O. Isótopos que não emitem radiações: para que servem? **Visão da Agroindústria**. Sertãozinho, São Paulo, v. 12, p. 25-26, set. 2004.

TYLER, G. Heavy metal pollution and soil enzymatic activity. **Plant and Soil**, v. 41, p. 303-311, 1974.

UHART, S.A.; ANDRADE, F.H. Nitrogen deficiency in maize. I. Effects on crop growth, development, dry matter partitioning, and kernel set. **Crop Science**, v.35, p.1376-1383, 1995.

USDA, 2013. **Fertilizer use and price**. Disponível em: <http://www.ers.usda.gov/data-products/fertilizeruse-and-price.aspx#26727>. Acesso em 21 jun.17.

USDA, 2016. Department of Agriculture. Foreign Agricultural Service. **World agricultural production**. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>. Acesso em 10 fev. 2016.

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

VAUGHAN, D., MACDONALD, I.R. Some effects of humic acid on cation uptake by parenchyma tissue. **Soil Biology and Biochemistry**. 8, 415–421. 1976.

VIEIRA-MEGDA, M.X. **Transformações do N derivado do fertilizante no solo e a eficiência de utilização pela cultura da cana-de-açúcar cultivado em solo coberto por palha**. 2013. 156 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

VILLA NOVA, N.A.; PEDRO JÚNIOR, M.; PEREIRA, A.R.; OMETTO, J.C. Estimativa de graus-dia acumulados acima de qualquer temperatura base, em função das temperaturas máxima e mínima. **Cadernos de Ciências da Terra**, n.30, 1972, 8p.

VITTI, G.C. **Avaliação e interpretação do enxofre no solo e na planta**. Jaboticabal: FUNEP, 1989. 37 p.

VITTI, A.C.; TRIVELIN, P.C.O.; GAVA, G.J.C.; PENATTI, C.P.; OLIVEIRA, M.W. Volatilização de amônia da adubação nitrogenada aplicada sobre solo coberto com palhada de cana-de-açúcar: efeito na produtividade da cana-soca. **Congresso Nacional dos Técnicos Açucareiros e Alcooleiros do Brasil**, 8. Recife: Anais...: Recife: STAB, 2002, p. 239-244.

WARNCKE, D.D.; BARBER, S.A. Ammonium and nitrate uptake by corn (*Zea mays* L.) as influenced by nitrogen concentration and NH_4^+ / NO_3^- ratio. **Agronomy Journal**, Madison, v.65, p.950-953, 1973.

WATSON, C.J.; MILLER H.; POLAND, P.; KILPATRICK, D.J.; ALLEN, M.D.B.; GARRET, M.K.; CHRISTIANSON, C.B. Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphorictriamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 26, p. 1165-1171, 1994.

WATSON, C.J. Urease activity and inhibition – Principles and practice. The International Fertilizer Society Meeting, 28/11/2000. London, **The International Fertilizer Society Proceedings**, n. 454, 39p. 2000.

WATSON, C. J.; AKHONZADA, N. A.; HAMILTON, J. T. G.; MATTHEWS, D. I. Rate and mode of application of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil use and Management*, v. 24, p. 246-253, 2008.

WISLIE, C.P. **Crop rotation and distribution**. São Francisco: W.H. Freeman and Company, 1962. 448p.

WOLF, B.; SNYDER, G. H. Sustainable soils. The place of organic matter in sustaining soils and their productivity. New York: **Food Products Press**, 352p. 2003.

YAMADA, T. O nitrogênio e o potássio na adubação da cultura do milho. **Informações Agronômicas**, n.78, junho 1997. p.14.

YAMAMOTO, C. F.; PEREIRA, E. I.; MATTOSO, L. H. C.; MATSUNAKA, T.; RIBEIRO, C. Slow release fertilizer based on urea/urea-formaldehyde polymer nanocomposites. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 390-397, 2016.

YONEYAMA, T. Characterization of natural ^{15}N abundance of soils. In: BOUTTON, T.W.; YAMASAKI, S.I. **Mass spectrometry of soils**. New York, p. 205-223, 1996.

YOUNG, C.C., CHEN, L.F. Polyamines in humic acid and their effect on radical growth of lettuce seedlings. **Plant Soil** 195, 143–149. 1997.

ZANDONADI, D.B.; CANELLAS, L.P.; FAÇANHA, A.R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H^+ pumps activation. **Planta**, New York, v. 225, p. 1538-1595, 2007.

ZHANG, H.M.; FORDE, B. G. An arabidopsis mads box gene that controls nutrient-induced changes in root architecture. **Science**, v. 279, p. 407-409, 1998.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A – Fotos do experimento conduzido em casa de vegetação da ESALQ/USP.

- I) Vista externa do local de condução do experimento;
- II) Incubação do solo durante 20 dias para reação dos fertilizantes de base;
- III) Dimensões espaciais da unidade experimental;
- IV) Arranjo espacial dos blocos;
- V) Processo de revestimento da $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ com SH no prato granulador;
- VI) $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ enriquecida em ^{15}N com SH de leonardita em prato granulador.

APÊNDICE B – Preparo e instalação do experimento.

- VII) Aplicação dos fertilizantes de base em betoneira para homogeneização;
- VIII) $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ armazenada em embalagem à vácuo antes da aplicação;
- IX) Aplicação da $\text{CO}(^{15}\text{NH}_2)_2$ em faixa a 5 cm de distância da planta;
- X) Plantas de milho no estágio V4 após aplicação dos tratamentos;
- XI) Coletor de volatilização;
- XII) Coletor de volatilização posicionado no centro da faixa de fertilizante;

APÊNDICE C – Fotos da avaliação e caracterização do sistema radicular após as colheitas.

- XIII) Sistema radicular do milho no estágio V8 logo após colheita da parte aérea;
- XIV) Separação do sistema radicular do solo por catação manual;
- XV) Secagem das raízes após lavagem em água corrente;
- XVI) Posicionamento das raízes em cuba de acrílico com água;
- XVII) Digitalização e obtenção da imagem das raízes após o escaneamento;
- XVIII) Caracterização morfológica do sistema radicular pelo software WinRhizo.

APÊNDICE D – Fotos do experimento conduzido em casa de vegetação.

- XIX) Plantas de milho no estágio V8 – 52 dias após a semeadura;
- XX) Plantas de milho no estágio VT – 62 dias após a semeadura;
- XXI) Separação da parte aérea em colmo, bainha, folhas, e órgão reprodutivo;
- XXII) Teste de coletores de volatilização antes da instalação do experimento;
- XXIII) Substâncias húmicas de leonardita (produto comercial KS 100®);
- XXIV) Vestígios de SH na superfície do solo após solubilização da ureia.

APÊNDICE E – Fotos das avaliações realizadas em solo e planta após as colheitas.

- XXV) Moagem do solo em moinho de bolas para análise dos teores de N;
- XXVI) Extração de N-NH_4^+ de espumas para quantificação da NH_3 volatilizada;
- XXVII) Amostras moídas pesadas em cápsulas de estanho em balança de precisão;
- XXVIII) Espectrômetro de massas acoplado a um analisador automático de N;
- XXIX) FIA Amônio: equipamento utilizado para determinação de N-NH_4^+ ;
- XXX) FIA Nitrato: equipamento utilizado para determinação de N-NO_3^- .

ANEXOS

ANEXO A – Teores de N-NH_4^+ , N-NO_3^- e N-mineral em mg kg^{-1} no solo avaliados nos estádios V8 e VT do milho, aos 52 e 62 dias após a semeadura, respectivamente.

Inibidor de urease	SH (%)				Média	SH (%)				Média	SH (%)				Média
	0	0,6	1,2			0	0,6	1,2			0	0,6	1,2		
1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)															
	--- N-NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹) ---					--- N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹) ---					--- N-total (mg kg ⁻¹) ---				
0,40%B + 0,15% Cu	16,8	23,2	21,3	20,4		0,4	1,4	0,2	0,6 a		17,1 Bb	24,5 Aa	21,5 Aa	21,1	
0,64% B	24,5	21,6	22,7	22,9		1,4	0,0	2,1	1,1 a		25,9 Aa	21,6 Aa	24,7 Aa	24,1	
Sem Inibidor	20,3	19,4	21,7	20,5		0,0	0,0	0,0	0,0 a		20,3 ABa	19,4 Aa	21,7 Aa	20,5	
NBPT	23,4	22,2	23,1	22,9		1,1	0,1	0,0	0,4 a		24,4 Aa	22,3 Aa	23,1 Aa	23,3	
Média	21,3	21,6	22,2	21,7*		0,7	0,4	0,6	0,5		22,0	21,9	22,8	22,2*	
Controle	-	-	-	18,4		-	-	-	0,0		-	-	-	18,4	
<i>P Inibidor</i>	0,09					<0,05					0,10				
<i>P SH</i>	0,35					0,25					0,32				
<i>P Inibidor x SH</i>	0,07					0,21					<0,05				
<i>P Trat x Controle</i>					<0,05					0,303					<0,05
2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)															
	--- N-NH ₄ ⁺ (mg kg ⁻¹) ---					--- N-NO ₃ ⁻ (mg kg ⁻¹) ---					--- N-total (mg kg ⁻¹) ---				
0,40%B + 0,15% Cu	19,2	16,1	14,5	16,6		0,0	0,0	0,1	0,0		19,0	16,1	14,5	16,5	
0,64% B	17,4	16,1	17,2	16,9		0,0	0,4	0,0	0,1		17,4	16,5	17,2	17,1	
Sem Inibidor	16,9	16,5	16,5	16,7		0,3	0,1	0,0	0,1		17,3	16,6	16,5	16,8	
NBPT	19,8	15,7	23,0	19,5		0,5	0,5	4,3	1,8		22,4	16,2	27,3	22,0	
Média	18,4 a	16,1 b	17,8 ab	17,4		0,2	0,2	1,1	0,5		19,0 a	16,3 b	18,9 ab	18,1	
Controle	-	-	-	18,2		-	-	-	0,5		-	-	-	18,8	
<i>P Inibidor</i>	0,17					0,08					0,12				
<i>P SH</i>	<0,05					0,63					<0,05				
<i>P Inibidor x SH</i>	0,08					0,73					0,16				
<i>P Trat x Controle</i>					0,17					0,16					0,14

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; NBPT) e sem inibidor; e letras minúsculas representam a diferença estatística entre as concentrações de SH (0,0; 0,6; 1,2%), obtidas pelo teste de LSD de Fischer ao nível de significância de 5%. A diferença entre a média dos tratamentos e a média do Controle foi identificada por *.

ANEXO B – Diâmetro médio (mm) e comprimento específico de raízes (m g^{-1}) de plantas de milho avaliadas nos estádios V8 e VT do milho, aos 52 e 62 dias após a semeadura.

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; e NBPT) e sem inibidor; e letras minúsculas representam a diferença estatística entre as concentrações de SH (0,0; 0,6; 1,2%) obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 20%.

ANEXO C – Eficiência de absorção de nitrogênio considerando a biomassa seca de raízes (EAN1), eficiência de absorção de nitrogênio considerando o comprimento do sistema radicular (EAN2), eficiência de transporte de nitrogênio (ETN), e eficiência de utilização de nitrogênio (EUTN), avaliados nos estádios V8 e VT do milho, aos 52 e 62 dias após a semeadura, respectivamente.

Inibidor de urease	SH (%)				Média	SH (%)				Média	SH (%)				Média	SH (%)				Média
	0	0,6	1,2			0	0,6	1,2			0	0,6	1,2			0	0,6	1,2		
	EAN (mg N g MS ⁻¹)					EAN (mg N m de raiz ⁻¹)					ETN (%)					EUTN (g MS g N ⁻¹)				
	1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)																			
0,40%B + 0,15% Cu	115,3	145,2	109,1	123,17		3,8 Ba	5,7 Aa	3,8 Ba	4,4		89,9	91,2	88,9	90,0		59,1	50,3	60,6	56,7 AB	
0,64% B	132,2	105,1	149,9	129,06		6,0 Aba	5,2 Aa	7,5 Aa	6,2		88,1	88,7	91,0	89,3		47,4	58,1	47,2	50,9 B	
Sem Inibidor	103,0	82,5	88,6	91,4		3,8 Ba	6,0 Aa	3,9 Ba	4,6		88,6	88,1	87,4	88,0		62,4	73,1	67,6	67,7 A	
NBPT	123,6	100,8	142,1	122,2		7,3 Aa	3,4 Ab	7,6 Aa	6,1		87,3	87,5	88,3	87,7		49,1	56,8	44,3	50,1 B	
Média	118,5	108,4	122,4	116,4*		5,2	5,1	5,7	5,3*		88,5	88,8	88,9	88,7		54,5	59,6	54,9	56,3*	
Controle	-	-	-	68,6		-	-	-	3,2		-	-	-	90,1		-	-	-	103	
P Inibidor			0,08					0,06					0,06					<0,05		
P SH			0,55					0,67					0,83					0,53		
P Inibidor x SH			0,35					<0,05					0,37					0,63		
P Trat x Controle			<0,05					<0,05					0,25					<0,05		
CV (%)			-					-					-					-		
2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)																				
0,40%B + 0,15% Cu	57,2	64,9	63,7	61,9 B		3,0	3,2	4,6	3,6 B		85,7	86,8	86,1	86,2		92,1	88,5	91,6	90,7 B	
0,64% B	77,5	64,4	86,8	76,2 A		2,8	2,2	2,3	2,5 B		87,3	85,4	87,7	86,8		74,7	80,5	72,6	76,0 C	
Sem Inibidor	50,1	49,3	53,4	51,0 B		2,0	2,4	3,3	2,6 B		86,2	84,4	85,3	85,3		113,0	107,6	105,2	108,6 A	
NBPT	99,9	79,8	71,7	83,8 A		6,7	5,0	5,5	5,7 A		86,0	88,3	86,9	87,1		61,4	79,4	83,1	74,6 C	
Média	71,2	64,6	68,9	68,2*		3,6	3,2	3,9	3,6*		86,3	86,2	86,5	86,3		85,3	89,0	88,1	87,5*	
Controle	-	-	-	37,0		-	-	-	1,8		-	-	-	86,1		-	-	-	172,7	
P Inibidor			<0,05					<0,05					0,41					<0,05		
P SH			0,50					0,44					0,95					0,69		
P Inibidor x SH			0,16					0,57					0,65					0,30		
P Trat x Controle			<0,05					<0,05					0,85					<0,05		
CV (%)			-					-					-					-		

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; NBPT) e sem inibidor; e letras minúsculas representam a diferença estatística entre as concentrações de SH (0,0; 0,6; 1,2%), obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%. A diferença entre a média dos tratamentos e a média do Controle foi identificada por *.

ANEXO D – Eficiências fisiológica (EF) e agrônômica (EA) no uso do N-fertilizante na parte aérea do milho avaliados nos estádios V8 e VT do milho, aos 52 e 62 dias após a semeadura.

Inibidor de urease	SH (%)			Média	SH (%)			Média
	0	0,6	1,2		0	0,6	1,2	
	EF (kg MS kg N ⁻¹)				EA (kg MS kg N ⁻¹)			
	1ª Avaliação - V8 (52 dias após a semeadura)							
0,40%B + 0,15% Cu	43,1 Aa	32,1 Ba	40,0 Aa	38,4	12,0 Aa	11,7 Aa	10,4 Ba	11,4
0,64% B	18,1 Bb	19,8 Bb	35,9a A	24,6	8,5 Ab	7,3 Bb	14,5 Aa	10,1
Sem Inibidor	37,4 Ab	57,4 Aa	36,8 Ab	43,9	12,9 Aa	11,9 Aa	10,5 Ba	9,0
NBPT	19,2 Ba	21,3 Ba	14,1 Ba	18,2	10,6 Aa	8,2 Aba	8,2 Ba	11,8
Média	29,4	32,6	31,7	31,3	11,0	9,8	10,9	10,6
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
P Inibidor	<0,05				0,08			
P SH	0,66				0,36			
P Inibidor x SH	<0,05				<0,05			
P Trat x Controle	-				-			
CV (%)	28,2				22,1			
	2ª Avaliação - VT (62 dias após a semeadura)							
0,40%B + 0,15% Cu	34,9	30,2	37,2	34,11 B	14,1	12,7	15,0	13,9 A
0,64% B	20,3	21,0	17,2	19,51 C	10,3	9,4	9,2	9,7 B
Sem Inibidor	52,9	48,7	41,7	47,8 A	13,8	14,3	13,2	13,8 A
NBPT	16,5	28,4	25,0	23,3 C	12,4	14,6	10,3	12,5 AB
Média	31,2	32,1	30,3	31,2	12,7	12,8	11,9	12,4
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
P Inibidor	<0,05				<0,05			
P SH	0,89				0,79			
P Inibidor x SH	0,44				0,77			
P Trat x Controle	-				-			
CV (%)	29,3				26,4			

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; NBPT) e sem inibidor; e letras minúsculas representam a diferença estatística entre as concentrações de SH (0,0; 0,6; 1,2%), obtidas pelo teste de LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.

ANEXO E – Perdas diárias e cumulativas de NH₃ (% do N aplicado) ao longo de 15 dias após aplicação dos fertilizantes em superfície.

Inibidor de urease	SH (%)			SH (%)			SH (%)		
	0	0,6	1,2	0	0,6	1,2	0	0,6	1,2
Perdas diárias de N-NH ₃ (% do N aplicado)									
	Dias 0-3			Dias 4-8			Dias 9-15		
0,40%B + 0,15% Cu	1,29 Ba	1,12 Ba	1,18 Ba	5,84 Bab	6,25 Aa	5,72 Ab	0,45 Ba	0,42 Ba	0,45 Ca
0,64% B	0,74 Cab	0,79 Ca	0,6 Cb	3,97 Cb	5,11 Ba	4,98 Ba	1,00 Aa	0,44 Bc	0,68 Bb
Sem Inibidor	2,57 Ab	4,84 Aa	5,33 Aa	6,72 Aa	5,28 Bc	5,81 Ab	0,37 Bab	0,49 Ba	0,3 Db
NBPT	0,05 Db	0,09 Da	0,09 Da	0,73 Db	2,66 Ca	2,40 Ca	0,42 Bb	0,95 Aa	1,02 Aa
<i>P Inibidor</i>		<0,05			<0,05			<0,05	
<i>P SH</i>		<0,05			<0,05			0,10	
<i>P Inibidor x SH</i>		<0,05			<0,05			<0,05	

Inibidor de urease	SH (%)			SH (%)			SH (%)		
	0	0,6	1,2	0	0,6	1,2	0	0,6	1,2
Perdas cumulativas de N-NH ₃ (% do N aplicado)									
	Dia 3			Dia 8			Dia 15		
0,40%B + 0,15% Cu	3,87 Ba	3,37 Ba	3,56 Ba	30,40 Ba	30,10 Ba	28,86 Ba	33,23 Ba	32,76 Ba	31,66 Ba
0,64% B	2,24 Cab	2,38 Ca	1,82 Cb	21,50 Cb	25,76 Ca	24,90 Ca	27,78 Ca	28,55 Ca	29,30 Ba
Sem Inibidor	7,73 Ab	14,52 Aa	16,04 Aa	36,43 Ab	36,86 Ab	40,63 Aa	38,79 Ab	40,05 Ab	42,61 Aa
NBPT	0,15 Db	0,29 Da	0,28 Da	4,33 Db	13,3 Da	12,23 Da	7,10 Db	19,40 Da	18,81 Ca
<i>P Inibidor</i>		<0,05			<0,05			<0,05	
<i>P SH</i>		<0,05			<0,05			<0,05	
<i>P Inibidor x SH</i>		<0,05			<0,05			<0,05	

Letras maiúsculas representam a diferença estatística entre os inibidores de urease (0,40% B + 0,15% Cu; 0,64% B; NBPT) e sem inibidor; e letras minúsculas representam a diferença estatística entre as concentrações de SH (0,0; 0,6; 1,2%), obtidas pelo teste LSD de Fischer ao nível de significância de 5%.