



ESTUDO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA NA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO TOTAL PELO MÉTODO DE KJELDAHL

Fernando Santos da Silva¹

Leandro Darc da Silva²

Edson Quintal Macedo³

Paulo Batista Mendes³

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência de diferentes condições de preparo de amostra para a determinação de nitrogênio total (NT) em tecido foliar. Durante o estudo três procedimentos foram avaliados: No primeiro foi utilizada uma mistura catalítica a base de selênio/sulfato de potássio em meio ácido. No segundo e terceiro foram utilizadas uma mistura composta por sulfato de cobre/sulfato de potássio em meio ácido sendo que no método três menores quantidades de reagentes foram utilizadas. De acordo com os resultados os valores de NT obtidos pelos três métodos apresentam coeficiente de variação (CV) menor que 15% e desvio padrão menor que 0,7. Ainda de acordo com resultados do *teste t* não existe diferença estatística entre a média das variáveis. Desta forma, o terceiro método empregando quantidades reduzidas de reagentes e mistura catalítica a base de sulfato de cobre/sulfato de potássio é o mais indicado de acordo com o estudo. Devido a menor quantidade de reagentes utilizados, redução do custo das análises, menor quantidade de resíduos gerados e a substituição do selênio na mistura catalítica que é uma ameaça ao meio ambiente e potencial carcinogênico.

Palavras-chave: Análise Química; Química Verde; Tecido Vegetal.

ABSTRACT

Study of different sample preparation conditions in the determination of total nitrogen by Kjeldahl method. The purpose of this work was to evaluate the influence of different conditions of the sample preparation to determination of total nitrogen (TN) in foliar tissue. During the study three sample preparation procedures were evaluated: The first one was used a catalytic mixture composed by selenium/sodium sulfate in acidic medium. In the second and third were used a mixture of copper sulfate/sodium sulfate in acid medium and in the method three a small amounts of reagents were used. According to the results NT values obtained by the three methods have a

¹ PPG em Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Araraquara, SP, Brasil. E-mail para correspondência: fernandoquimicauems@hotmail.com

² PPG em Biologia Geral/Bioprospecção, Universidade Federal da Grande Dourados – UFGD, Dourados, MS, Brasil.

³ Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN, Dourados, MS, Brasil.

variation coefficient (VC) less than 15% and a standard deviation less than 0.7. Also the *t test* results showed that there is no significant difference between the mean of the variables. The third method using small amounts of reagents and the catalyst mixture based on copper sulfate/sodium sulfate is the most indicated according the study. Due to the smaller amount of reactants used, reducing the analysis cost, less waste generated, and the substitution of selenium in the catalyst mixture that is hazardous to the environment and carcinogenic potential.

Keywords: Chemical Analysis; Green Chemistry; Plant Tissue.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a produção agrícola tem evoluído de forma exponencial. O desenvolvimento de novas tecnologias no campo, variedades de sementes, pesticidas mais seletivos e a avaliação do estado nutricional da cultura, por meio de análises química, tem alavancado a produção no setor. Com o crescimento do número de produtores interessados em conhecer o estado nutricional de uma cultura a quantidade de laboratórios especializados em análise de tecido foliar tem aumentado no país sendo que a determinação de nitrogênio total (NT) tem sido uma das rotinas mais executadas.

A preocupação em monitorar o teor de NT nas diferentes culturas é de relevante importância. É grande a exigência desse elemento, consequência de sua função estrutural, pois este faz parte da composição de diversas substâncias orgânicas como os aminoácidos e proteínas, além de ser ativador enzimático e participar diretamente da absorção iônica, fotossíntese, respiração, multiplicação e diferenciação celular (Marschner, 1995; Deuner *et al.*, 2008). Quando há um suprimento adequado deste nutriente as plantas se desenvolvem rapidamente, ao contrário, quando há deficiência sua evolução é bastante afetada (Pioneer, 1995; Andrade *et al.*, 2003; Da Silva *et al.* 2005). Por outro lado o excesso de nitrogênio pode também prolongar o ciclo vegetativo afetando a produção de grãos e frutos (Pioneer, 1995; Costa, 2000). Nas forragens a quantidade de nitrogênio é muito importante, forragens com teor adequado de nitrogênio dão origem a altas produções de carne e leite (Cecato *et al.*, 2005).

Devido à importância de determinar o teor de NT em tecido foliar diferentes metodologias têm sido propostas (Burns, 1984; Carneiro *et al.*, 2001; Margesin e Schinner, 2005; Martins e Reissmann, 2007). Burns (1984) descreve o método de Kjeldahl, o mais utilizado, devido a sua fácil execução e confiabilidade dos resultados. Desenvolvido por Kjeldahl este método consiste em três etapas principais: Digestão da amostra, que utiliza uma mistura de sulfato de potássio (K_2SO_4) e selênio (Se) em pó em meio de ácido sulfúrico (H_2SO_4) fumegante; Destilação, que separa o nitrogênio por arraste de vapor e Quantificação, utilizando método titulométrico com solução de ácido clorídrico. No entanto a grande quantidade de resíduos ácidos gerados e o uso do selênio que é um potencial carcinogênico (Faithfull, 2002) são problemas inerentes deste método. Outros

trabalhos adaptados a partir do método de Kjeldahl também são descritos na literatura (Bremner, 1965; Nogueira *et al.*, 1998). Estas adaptações têm como objetivo buscar novos procedimentos de execução, mais rápidos, com menores custos, uso de reagentes menos nocivos ou em quantidades reduzidas e geração de resíduos com menor impacto ao meio ambiente (Skoog *et al.*, 2007).

Nogueira *et al.* (1998) descreve uma metodologia adaptada que envolve a decomposição nitro-perclórica utilizando ácido perclórico (HClO_4)/ácido nítrico (HNO_3) e catalisador de sulfato de cobre (CuSO_4). No entanto este método provoca a geração de um grande volume de resíduos ácidos. Também a aquisição dos ácidos utilizados torna o procedimento inviável em grande parte dos laboratórios. Isso porque os dois reagentes tem comercialização bastante restrita que nem sempre pode ser facilmente atendidas por grande parte dos laboratórios do país, o que torna oneroso a execução dos experimentos. Em outro método descrito por Bremner (1965), foi utilizada na etapa de preparo da amostra, uma mistura de ácido sulfúrico (H_2SO_4), sulfato de potássio (K_2SO_4) / sulfato de cobre (CuSO_4) e selênio em pó. As alterações dos reagentes, proposta neste método, não influenciaram significativamente nos resultados e na precisão do método, no entanto, o volume de ácido sulfúrico utilizado e os resíduos de selênio geram quantidades de resíduos consideráveis.

Este trabalho propõe a modificação da metodologia de Kjeldahl avaliando o uso de quantidades reduzidas de ácido sulfúrico e o uso de uma mistura catalítica a base de sulfato de potássio/sulfato de cobre com o objetivo de minimizar os resíduos gerados e o impacto ao meio-ambiente.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Solos e Plantas do Centro Universitário da Grande Dourados (Unigran). Durante o estudo foram utilizadas dez amostras de tecido vegetal de milho da espécie híbrido 30A37 (*Zea mays*), coletadas aos dois meses de cultivo na área experimental da Unigran situada na cidade de Dourados-MS. Após a coleta as amostras foram levadas para laboratório sendo lavadas com água destilada, acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação forçada de ar a 50 °C por 24 h. Em seguida foram trituradas em moinho do tipo Willey e armazenadas em frascos de polietileno.

Todos os reagentes utilizados durante os experimentos são de grau analítico: Ácido sulfúrico H_2SO_4 98% ($d=1,84 \text{ g. mL}^{-1}$) (Vetec), ácido clorídrico HCl 36% ($d=1,19 \text{ g. mL}^{-1}$) (Vetec), sulfato de potássio Na_2SO_4 99,8% (Sigma Aldrich), selênio (Se) 99,8% (Sigma Aldrich), sulfato de cobre Cu_2SO_4 99,8% (Sigma Aldrich), ácido bórico H_3BO_3 99,9% (Vetec), hidróxido de sódio NaOH 99 % (Vetec), vermelho de metila $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ 99,9% (Vetec) e verde de bromocresol $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$

99,9% (Vetec). Para o preparo das soluções foi utilizada água Milli-Q (18,2 M Ω cm). A determinação do NT foi realizada com dez amostras pelo método de Kjeldahl e com outros dois métodos adaptados da metodologia original. Foi avaliado o uso de três procedimentos diferentes de digestão de amostra e foram feitas seis repetições para cada amostra como descrito a seguir:

O primeiro procedimento (DG1) foi realizado de acordo com a metodologia de Kjeldahl (Burns, 1984). Inicialmente 0,2 g de amostra foram pesadas em tubos de digestão em seguida foram adicionadas 2 g da mistura catalítica composta de selênio/sulfato de potássio (10% de selênio e 90% de sulfato de potássio (m/m)). Após esta etapa foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico.

No segundo procedimento (DG2) foram realizadas algumas modificações em relação à metodologia descrita por Kjeldahl (Burns, 1984). Foram pesadas 0,2 g de amostra e adicionadas ao tubo de digestão 1 g da mistura catalítica composta de sulfato de cobre/sulfato de potássio (10% de sulfato de cobre e 90% de sulfato de potássio (m/m)). Após esta etapa foram utilizados 2 mL de ácido sulfúrico.

Para definir as proporções de reagente utilizadas no terceiro procedimento (DG3) foi realizado um estudo prévio com o objetivo de determinar qual a quantidade mínima de reagentes (mistura catalítica/ácido) poderiam ser utilizados sem comprometer a reprodutibilidade dos resultados. Os estudos mostraram que utilizando até 0,5 g da mistura catalítica composta de sulfato de cobre/sulfato de potássio (10% de sulfato de cobre e 90% de sulfato de potássio (m/m)) e 1 mL de ácido sulfúrico os resultados obtidos eram reprodutíveis em relação aos resultados obtidos pelo método de Kjeldahl. A tabela 1 apresenta a proporção de cada um dos reagentes utilizados durante o procedimento de preparo de amostra.

Tabela 1. Quantidades de reagentes utilizados na etapa de digestão da amostra para a determinação de NT pelas diferentes metodologias.

Componentes	DG1	DG2	DG3
Amostra (g)	0,2	0,2	0,2
Mistura catalítica (g)	2	1	0,5
Ácido sulfúrico (mL)	5	2	1

Para todos os procedimentos avaliados a determinação de NT consistiu em quatro etapas: Na primeira descrita anteriormente as amostras foram pesadas em tubos sendo adicionada a mistura catalítica e ácido sulfúrico concentrado. A segunda etapa consiste na digestão da amostra. Nesta etapa as amostras foram levadas para aquecimento em bloco digestor (Microdigestor de Kjeldahl Q327M) e aquecidas a 320 °C por um tempo de 1 h (Figura 1A). Na terceira etapa, destilação, o

tubo contendo a amostra foi montado em um destilador de nitrogênio (Destilador de nitrogênio/proteína TE-0364) e adicionou-se solução de hidróxido de sódio 6 mol L^{-1} . O nitrogênio presente na solução foi destilado para uma solução indicadora de ácido bórico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ contendo uma mistura dos indicadores de vermelho de metila e verde de bromocresol. Na quarta e última etapa quantificação, o teor de NT foi determinado por meio de titulação volumétrica, onde a solução indicadora contendo o NT coletado na destilação foi titulada com uma solução padronizada de ácido clorídrico (HCl) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ a fim de se determinar a quantidade de NT na amostra.

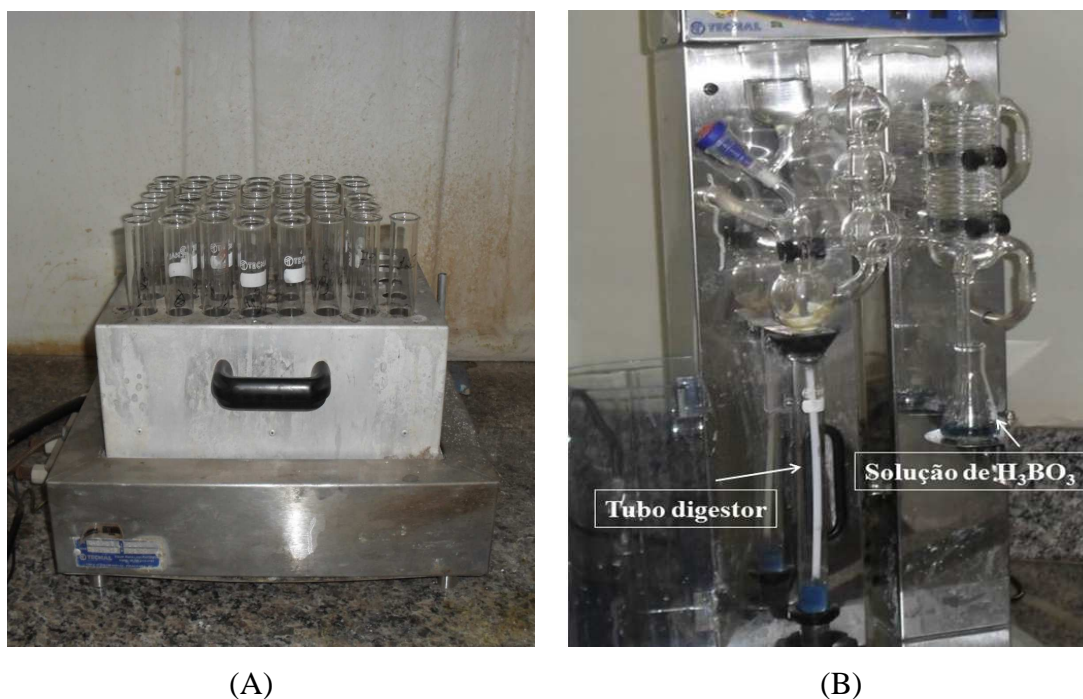


Figura 1. A) Digestão das amostras em bloco digestor a aproximadamente $320 \text{ }^\circ\text{C}$. B) Destilação do NT por arraste de vapor.

O volume de ácido gasto durante a titulação é utilizado na equação seguinte para determinar o teor de NT em percentagem:

$$NT = \frac{(V_a - V_b) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100}{P1}$$

Onde:

NT – teor de nitrogênio total na amostra, em percentagem;

V_a – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação da amostra (mL);

V_b – volume da solução de ácido clorídrico gasto na titulação do branco (mL);

F – fator de correção para o ácido clorídrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$;

P1 – massa da amostra (em gramas).

Foi também determinado o teor de proteína bruta (PB), neste caso multiplicando-se o valor de NT encontrado pelo método de Kjeldahl por um fator de conversão FN= 6,25 (Nogueira e Souza, 2005).

$$PB = NT \times FN$$

Onde:

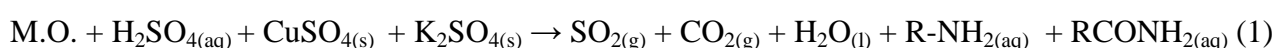
PB – teor de proteína bruta na amostra, em percentagem;

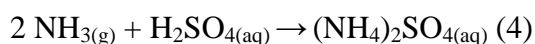
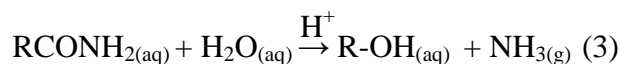
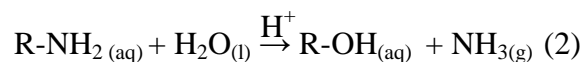
FN – 6,25

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A etapa de digestão da amostra, avaliada neste trabalho, é responsável pela eliminação de interferentes da análise e obtenção do nitrogênio em uma forma quimicamente estável para sua posterior quantificação. O uso da mistura catalítica e ácido sulfúrico proporciona a decomposição da matéria orgânica do tecido foliar a dióxido de carbono (CO₂) que facilmente se desprende conforme descrito na equação (1). Durante a etapa de digestão da amostra pelo método proposto por Kjeldahl foram utilizados 10 mL de ácido sulfúrico essa quantidade considerada elevada leva a alguns problemas durante a análise. Utilizando uma grande quantidade de ácido é necessária uma maior adição de sulfato de potássio, pois este tem o papel de aumentar o ponto de ebulição da amostra impedindo a volatilização do ácido sulfúrico. Isso ocasiona a geração de maior quantidade de resíduos sólidos e ácidos por isso nos procedimentos DG2 e DG3 as quantidades de ácido foram minimizadas.

Na etapa de digestão da amostra é difícil definir a exata equação química envolvida no processo de decomposição da matéria orgânica (equação 1). Isso porque a matéria orgânica (M.O.) foliar é bastante complexa, dezenas de compostos participam da sua composição, como por exemplo, aminas, amidas, nitrilas entre outros. Durante a digestão da amostra os compostos nitrogenados que fazem parte da M.O. são convertidos em sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) como apresentado nas equações de 1 a 4:





Durante o processo de digestão da amostra a solução passa de uma coloração escura, etapa em que ocorre a decomposição da matéria orgânica (Figura 2A), para verde claro obtendo-se o sal de sulfato de amônio (Figura 2B). Conforme os resultados obtidos tanto o selênio quanto o sulfato de cobre tiveram boa atividade como catalisador, isso porque, a digestão da amostra foi realizada dentro do tempo estabelecido. O catalisador basicamente atua aumentando a velocidade da reação de decomposição da matéria orgânica diminuindo o tempo necessário para a digestão da amostra (Burns, 1984; Margesin e Schinner, 2005; Martins e Reissmann, 2007).

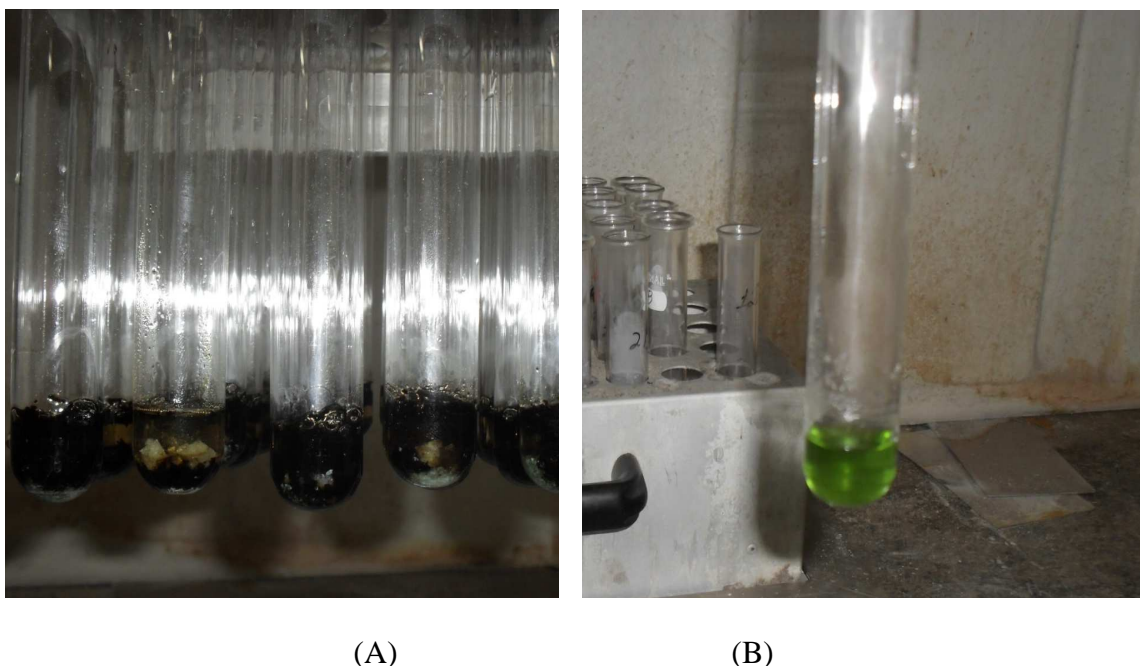
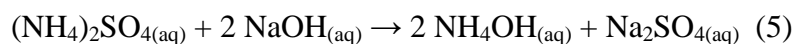


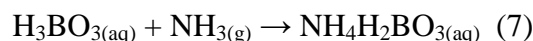
Figura 2. A) Amostras antes da etapa de digestão. B) Amostra após a etapa de digestão.

Ao sulfato de amônio formado na etapa de digestão foi adicionada uma solução de hidróxido de sódio com o objetivo de tornar o meio alcalino favorecendo a formação da amônia que será destilada na etapa seguinte conforme as equações (5-6):

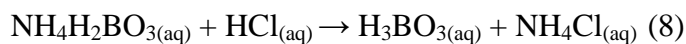


Para o procedimento de Kjeldahl o uso de elevada quantidade de ácido sulfúrico na etapa de digestão tornou necessário o uso de uma elevada quantidade de hidróxido de sódio para neutralizar o ácido presente ($\approx 15\text{mL}$) e tornar o meio alcalino. Além do aumento do volume de reagentes utilizados e maior geração de resíduos podem ocorrer ainda riscos operacionais ao analista devido a forte reação exotérmica de neutralização do ácido.

Com o início da destilação a amônia foi separada por arraste de vapor até ser condensada e desprendida na solução indicadora de ácido bórico. Conforme a amônia é destilada e coletada na solução de ácido bórico ocorre uma mudança de coloração devido à formação do borato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$) conforme a equação a seguir:



A última etapa do processo corresponde à titulação do borato de amônio $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ (Figura 3A) com uma solução padrão de ácido clorídrico ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$). No ponto de viragem da titulação a solução azul torna-se laranja (Figura 3B), indicando que todo o borato de amônio formado reagiu com a solução padrão ácida adicionada. Proporcionalmente quanto maior a quantidade de nitrogênio na amostra maior será a quantidade de ácido clorídrico gasto na titulação. As reações desta etapa são descritas a seguir:



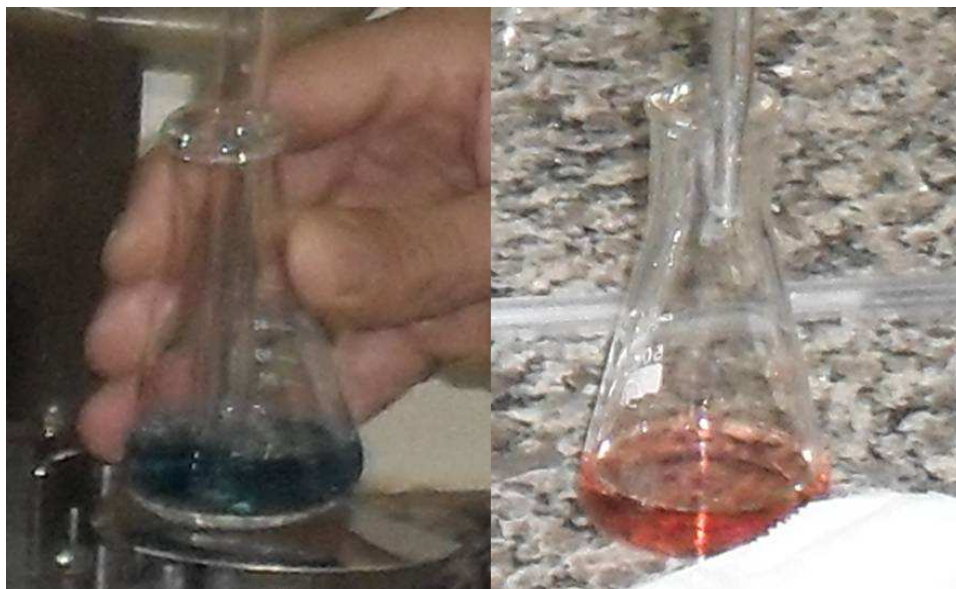


Figura 3. A) Solução indicadora após a formação do borato de amônio. B) Solução indicadora após o ponto de viragem para determinação de NT.

As tabelas 2 e 3 apresentam os valores médios, desvio padrão (σ) e coeficiente de variação (C_v) de NT e PB referentes a seis repetições feitas para cada procedimento. Os resultados obtidos de NT e PB estão próximos do valor esperado para a cultura do milho. O valor médio de NT da análise das dez amostras utilizando o procedimento DG1 foi de $3,4 \pm 0,9$ %, para DG2 $3,5 \pm 0,3$ % e DG3 $3,42 \pm 0,4$ %. De acordo com Malavolta (2006) e Trani *et al.* (1983), valores médios de NT para a cultura do milho são de aproximadamente 2,8 a 3,5 %. Comparando os resultados dos três procedimentos, os baixos valores de desvio padrão ($<0,7$) e coeficiente de variação menor que 16% (Tabela 2) indicam que existe boa reprodutibilidade entre os procedimentos propostos o que confirma a robustez dos procedimentos adaptados (Pimentel, 1985 e Skoog *et al.*, 2007). Conforme o critério de classificação do coeficiente de variação para análise foliar descrito por Warrick e Nielsen (1980) os valores de C_v obtidos são classificados como baixos para a determinação de NT. Bernardi *et al.* (2002) classifica como alto valores de C_v em torno de 27% para a determinação de nutrientes em tecido foliar.

Tabela 2. Comparação da média dos resultados de nitrogênio total (NT) em porcentagem (%) obtida pelos três métodos e valores de desvio padrão e coeficiente de variação.

Amostra	*DG1 _{NT}	*DG2 _{NT}	*DG3 _{NT}	Média _{NT}	σ_{NT}	CV _{NT}
1	2,7	4,0	3,7	3,4	0,7	15,2
2	2,3	3,0	3,6	2,9	0,6	16,7
3	4,4	3,5	2,9	3,6	0,7	15,1
4	3,5	3,4	3,9	3,6	0,2	15,0
5	2,8	3,5	2,6	3,4	0,6	15,4
6	2,7	4,0	3,6	4,0	0,7	14,3
7	4,9	3,8	3,5	3,1	0,7	16,0
8	2,4	3,4	3,7	3,8	1,1	14,4
9	5,2	3,2	3,2	3,2	0,2	16,0
10	3,1	3,2	3,5	3,5	0,3	15,1

* Valor médio de seis repetições realizado para o procedimento.

Tabela 3. Comparação da média dos resultados de proteína bruta (PB) em porcentagem (%) obtida pelos três métodos e valores de desvio padrão e coeficiente de variação.

Amostra	DG1 _{PB}	DG2 _{PB}	DG3 _{PB}	Média	σ_{PB}	CV _{PB}
1	17,2	24,8	23,3	21,7	4,0	6,2
2	14,1	18,7	22,3	18,3	4,1	6,7
3	27,4	21,9	18,2	22,5	4,6	6,0
4	21,8	21,4	24,1	22,4	1,4	6,1
5	18,5	22,1	16,3	18,9	2,9	15,4
6	16,6	25,3	22,8	21,5	4,5	6,2
7	30,5	24	21,8	25,4	4,5	5,7
8	15,1	21,2	23,3	19,8	4,25	6,4
9	32	20	20,2	24,0	6,80	5,8
10	19,2	20	21,6	20,3	1,20	6,4

Os resultados de NT também foram avaliados utilizando o teste *t* através da análise de variâncias ($\alpha=0,05$). O teste foi realizado com o objetivo de verificar a diferença estatística entre as médias dos resultados entre o procedimento padrão e os procedimentos adaptados. Foram comparados os resultados da metodologia de Kjeldahl (DG1) e DG2 e entre Kjeldahl (DG1) e DG3. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 4 e 5. A média das variáveis para o procedimento DG1 foi de $3,4 \pm 1$ valor muito semelhante ao encontrado para DG2 3,5 e DG3 3,42. O parâmetro, $P(T \leq t)$ bi-caudal, para os dois casos foi $> 0,05$ indicando que de acordo com os

resultados não existe diferença estatística entre as médias das variáveis (hipótese nula), ou seja, os resultados dos métodos modificados e do método de Kjeldahl corroboram.

Tabela 4. Valores estatísticos obtidos utilizando *teste t* comparando os resultados de NT obtidos entre os procedimentos DG1 e DG2.

Parâmetro	DG1	DG2
Média	3,40	3,5
Variância	1,12	0,11
Observações	10,00	10,00
Stat t	0,28	
P(T<=t) uni-caudal	0,39	
t crítico uni-caudal	1,79	
P(T<=t) bi-caudal	0,78	
t crítico bi-caudal	2,20	

Tabela 5. Valores estatísticos obtidos utilizando *teste t* comparando os resultados de NT obtidos entre os procedimentos DG1 e DG3.

Parâmetro	DG1	DG3
Média	3,40	3,42
Variância	1,12	0,16
Observações	10,00	10,00
Stat t	0,05	
P(T<=t) uni-caudal	0,47	
t crítico uni-caudal	1,78	
P(T<=t) bi-caudal	0,95	
t crítico bi-caudal	2,17	

Com base nos resultados obtidos, o uso dos três procedimentos pode ser empregado para a determinação de NT, contudo, o uso do procedimento DG3 é o mais viável. Diversos fatores favorecem a utilização deste procedimento, tais como, o uso de menores proporções de reagentes, menor geração de resíduos, substituição do selênio por sulfato de cobre como catalisador e a diminuição do custo das análises. Este último bastante importante, visto que laboratórios de análise de rotina trabalham com um elevado número de amostras.

De acordo com Nogueira e Souza (2005), grande parte dos laboratórios de análise de rotina analisa em média 900 amostras de tecido foliar por mês. O uso do procedimento DG3 em relação à metodologia original gera um custo de até 13,3 % menor em relação ao uso de NaOH, 20% menor em relação ao H₂SO₄ e de até 25% menor em relação a massa de mistura catalítica, o que pode fornecer uma economia média mensal de até 19,5% nas análises. Além disso, a quantidade de resíduos gerados durante o desenvolvimento deste trabalho pelo procedimento DG3 foi 15% menor em relação ao procedimento DG1 o que torna mais fácil a destinação e tratamento dos resíduos.

CONCLUSÕES

Os resultados de NT obtidos mostram que os procedimentos propostos neste trabalho fornecem resultados reprodutíveis em relação ao procedimento original. Os resultados mostram que a determinação do teor de NT pode ser realizada utilizando um método de menor custo e de menor geração de resíduos DG3. Este método é o mais viável para a quantificação do analito, devido a menor proporção de reagentes, baixa geração de resíduos e menores custos. Este método ainda dispensa o uso do Selênio para a decomposição da matéria orgânica sendo utilizado o catalisador a base de sulfato de cobre.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A. C. et al. 2003. Adubação nitrogenada e potássica em capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum. cv. Napier). **Ciência e Agrotecnologia**, **1**:1643-1651.
- BERNARDI, A. C. C. et al. 2002. **Variabilidade espacial de teores de nutrientes em folhas de soja como ferramenta para agricultura de precisão**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 5p.
- BREMNER J. M. 1965. Total Nitrogen. **Methods of soil analysis**. Part 2 - Chemical and Microbiological Properties. USA: American Society of Agronomy, 1149p.
- BURNS, D. T. 1984. Kjeldahl, the man, the method and the Carlsberg laboratory. **Analytical Proceedings**, **21**(6):210-214.
- CARNEIRO, J. M. T. et al. 2001. Determinação indireta de n-total em plantas por espectrometria de absorção atômica com chama empregando uma mini-coluna de AgCl. **Scientia Agricola**, **58**(1):151-155.

CECATO, U. et al. **Pastagens para produção de leite**. Disponível em: <<http://www.nupel.uem.br/pos-ppz/pastagens-08-03.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2015.

COSTA, A. M. 2000. **Adubação nitrogenada na cultura do milho (*Zea mays* L.) em sistema de plantio direto**. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrônomicas) – Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, 90p.

DA SILVA, E. C. et. al. 2005. Doses e épocas de aplicação de nitrogênio na cultura do milho em plantio direto sobre Latossolo Vermelho. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, **29**(3):353-362.

DEUNER, S. et. al. 2008. Adubação foliar e via solo de nitrogênio em plantas de milho em fase inicial de desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, **32**(5):1359-1365.

FAITHFULL, N. T. 2002. **Methods in agricultural chemistry analysis**. New York: CABI, 57p.

MALAVOLTA, E. 2006. **Manual de nutrição mineral de plantas**. Piracicaba: Ceres, 631p.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. 2005. **Manual of soil analysis monitoring and assessing soil bioremediation**. 5. ed. Innsbruck: Springer, 79p.

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

MARTINS, A P. L.; REISSMANN, C. B. 2007. Material vegetal e as rotinas laboratoriais nos procedimentos químico-analíticos. **Scientia Agraria**, **8**(1):1-17.

NOGUEIRA, A. R. de A. et al. (Eds.). 1998. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos: EMBRAPA - CPPSE, 72p.

NOGUEIRA, A. R. de A.; SOUZA, G. B. de. (Eds.). 2005. **Manual de laboratórios: solo, água, nutrição vegetal, nutrição animal e alimentos**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 334p.

PIMENTEL GOMES, F. 1985. **Curso de Estatística Experimental**. São Paulo: Nobel, 467p.

PIONEER. 1995. Efeitos do nitrogênio. **Revista Área Polo**, **5**(11):6-12.

RAMALHO, E. Z.; MANNIGEL, A. R. **Efeito de diferentes doses de uréia no teor de nitrogênio das folhas de pereskia aculeata**. Disponível em: <http://www.cesumar.br/prppge/pesquisa/mostras/vi_mostra/evandro_zibordi_ramalho_2.pdf>. Acesso em: 5 jun. 2016.

SKOOG, D. et al. 2007. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thomson, 114p.

- TRANI, P. E.; HIROCE, R.; BATAGLIA, O. C. 1983. **Análise foliar**: amostragem e interpretação. Campinas: Fundação Cargill, 18p.
- WARRICK, A. W.; NIELSEN, D. R. 1980. Applications of soil physics. In: D. Hillel (Org.). **Spatial variability of soil physical properties in the field**. New York: Academic Press, p. 319-344.