

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE
KJELDAHL NA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO E SUA
APLICAÇÃO NA ANÁLISE FOLIAR**

MATHEUS ANTÔNIO ARAÚJO

Uberlândia

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA INDUSTRIAL

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE
KJELDAHL NA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO E SUA
APLICAÇÃO NA ANÁLISE FOLIAR**

MATHEUS ANTÔNIO ARAÚJO

Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção
do grau de bacharel em Química Industrial
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia.

Orientador: Wellington de Oliveira Cruz

Uberlândia

2019

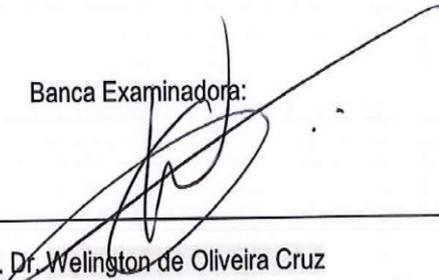
MATHEUS ANTÔNIO ARAÚJO

**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA: AVALIAÇÃO DO MÉTODO DE
KJELDAHL NA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO E SUA
APLICAÇÃO NA ANÁLISE FOLIAR**

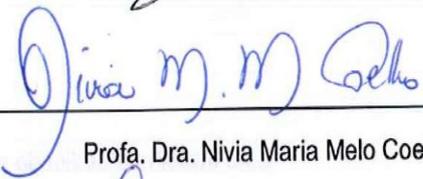
Trabalho de Conclusão de Curso para obtenção
do grau de bacharel em Química Industrial
apresentado ao Instituto de Química da
Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, Maio de 2019.

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz



Profa. Dra. Nivia Maria Melo Coelho



Prof. Dr. Deividi Marcio Marques

Este trabalho é dedicado aos meus pais, amigos e familiares que comigo estiveram durante essa jornada de muito estudo, dedicação, e esforço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me ajudar a superar as dificuldades e adversidades vividas durante a jornada deste trabalho.

A Universidade Federal de Uberlândia, e seus profissionais que nela integram, pela oportunidade e conhecimento compartilhado.

Aos professores do Instituto de Química pela dedicação, compromisso e sua imensa contribuição com conhecimento. Em especial ao professor Dr. Welington de Oliveira Cruz pelos ensinamentos, confiança e orientação durante o curso e nesse trabalho. Ao secretário do curso de Química Industrial Hugo Rocha pela atenção dada durante todo o curso.

Aos meus pais que me proporcionaram a possibilidade de estudar e me deram total suporte durante toda a graduação, aos meus irmãos e demais familiares, pelo apoio e dedicação. Agradeço por tudo que fizeram por mim, e por não medirem esforços para me ajudar nos momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos pelo apoio e consideração. E ainda pelo apreço e confiança em nosso curso, buscando somar conhecimentos e caráter com todos que nele integram.

Agradeço também a Associação Atlética Acadêmica Exatas pela experiência única que me proporcionou e por todos os momentos inesquecíveis passados na instituição

“Nunca deixe nada em branco. Aquele que tentou
e não conseguiu, é superior aquele que não
tentou.”

RESUMO

Atualmente estudos relacionados a análise de nitrogênio e sua ampla empregabilidade vem mostrando como é grande e vasto seu campo de aplicação. Sendo amplamente difundido no meio acadêmico e aplicado no cotidiano rotineiro de empresas. Com isso o presente estudo teve como objetivo descrever a importância do método de Kjeldahl e avaliar sua ampla empregabilidade no campo da agricultura. Apresentando também métodos alternativos ou similares como forma de demonstrar seus efeitos e comparar sua importância aplicada a análise foliar aplicada a agricultura. Evidenciaram-se as suas especificidades comparadas aos demais métodos existentes na literatura científica, comparando-os ao método de Kjeldahl. Foi realizado uma revisão de literatura com seu respectivo histórico, objetivos, importâncias e referências de artigos de revistas especializadas e livros. Os resultados demonstram que embora existam vários estudos indicando mudanças e melhorias no método de Kjeldahl, podemos considerar que ainda assim o método é considerado satisfatório quando aplicado a análise de nitrogênio foliar, e que os demais estudos comparados são de extrema importância quanto a sua contribuição científica e tecnológica para a ciência.

Palavras Chave: Nitrogênio. Kjeldahl. Análise Foliar. Agricultura.

ABSTRACT

Currently, studies related to nitrogen analysis and its wide employability have shown how wide and broad is its field of application. Being widely diffused in the academic environment and applied in the daily routine of companies. The aim of this study was to describe the importance of the Kjeldahl method and to evaluate its wide employability in the field of agriculture. Also presenting alternative or similar methods as a way of demonstrating their effects and comparing their applied importance to applied foliar analysis to agriculture. Its specificities were compared to the other existing methods in the scientific literature, comparing them to the Kjeldahl method. A literature review was carried out with its respective history, objectives, importance and references of articles from specialized magazines and books. The results demonstrate that although there are several studies indicating changes and improvements in the Kjeldahl method, we can consider that the method is still considered satisfactory when applied to leaf nitrogen analysis, and that the other comparative studies are extremely important as regards their scientific contribution and technology for science.

Keywords: Nitrogen. Kjeldahl. Foliar Analysis. Agriculture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da clorofila a e clorofila b.....	12
Figura 2 - Detalhamento das principais diferenças das clorofilas a e b.....	13
Figura 3 - Representação da rota de assimilação do nitrogênio nas plantas.....	14
Figura 4 - Representação da molécula de Citosol.....	15
Figura 5 - As organelas intramembranas distribuídas por todo o citoplasma.....	16
Figura 6 - Reações que ocorrem nas etapas de digestão, destilação e titulação de nitrogênio pelo método Kjeldahl.....	17
Figura 7 - (A) Digestão de amostras para a determinação de nitrogênio total. (B) Mudança de coloração da solução no processo da digestão.....	27
Figura 8 - Reações que ocorrem na etapa de digestão de Nitrogênio.....	28
Figura 9 - Reações que ocorrem na etapa de destilação.....	28
Figura 10 - (A) Processo de destilação. (B) Formação do borato de amônio.....	29
Figura 11 - (A) Titulação para a determinação da dosagem de nitrogênio. (B) Viragem na titulação para a determinação da dosagem de nitrogênio total.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GOGAT	Sintetase do Glutamato
GS	Sintetase da Glutamina
MS	Matéria seca
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NIR	Near infrared
RN	Redutase do Nitrato
RNA	Ácido Ribonucleico
RNi	Redutase do Nitrito

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVO.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 METODOLOGIA.....	18
4 REVISÃO DE LITERATURA	19
4.1 HISTÓRICO.....	19
4.2 EMPREGABILIDADE DO MÉTODO KJELDAHL NA CIENCIA.....	22
4.2.1 Importância da análise de nitrogênio e análise bromatológica.....	23
4.2.2 Importância do Nitrogênio na Agricultura.....	25
4.3 PROPRIEDADES DO MÉTODO KJELDAHL.....	26
4.3.1 Pré Tratamento.....	30
4.4 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NITROGENIO.....	31
4.5 COMPARATIVO DOS PRINCIPAIS MÉTODOS E SUAS EFICIENCIAS.....	33
5 CONCLUSÃO.....	34
6 REFERENCIAS.....	35

1 INTRODUÇÃO

O aumento da população vem ocorrendo de forma contínua. E como consequência dessa expansão, vem acontecendo uma maior demanda por alimentos à medida que a massa populacional aumenta, gerando a necessidade de se ter maior eficiência na produtividade de alimentos, nas áreas cultivadas. E para que essa eficiência seja sustentável, é necessário buscar produzir cada vez mais em áreas menores, otimizando a produção. (EMBRAPA, 2000).

O nitrogênio é um nutriente muito importante para as plantas, e visando estes sistemas de produção, a sua disponibilidade para a alta produtividade é quase sempre um fator limitante, influenciando no crescimento da planta mais do que qualquer outro nutriente. Por isso, o nitrogênio tem sido muito estudado para maximizar a eficiência do seu uso (BREDEMEIER E MUNDSTOCK, 2000).

Devido a isso se tem procurado diminuir as perdas do nitrogênio no solo, bem como melhorar a absorção e a metabolização do mesmo no interior da planta. Ainda sobre as perdas de nitrogênio, de acordo com Anghinoni, (1986, p.1-18, apud Bredemeier e Mundstock, 2000, p.2):

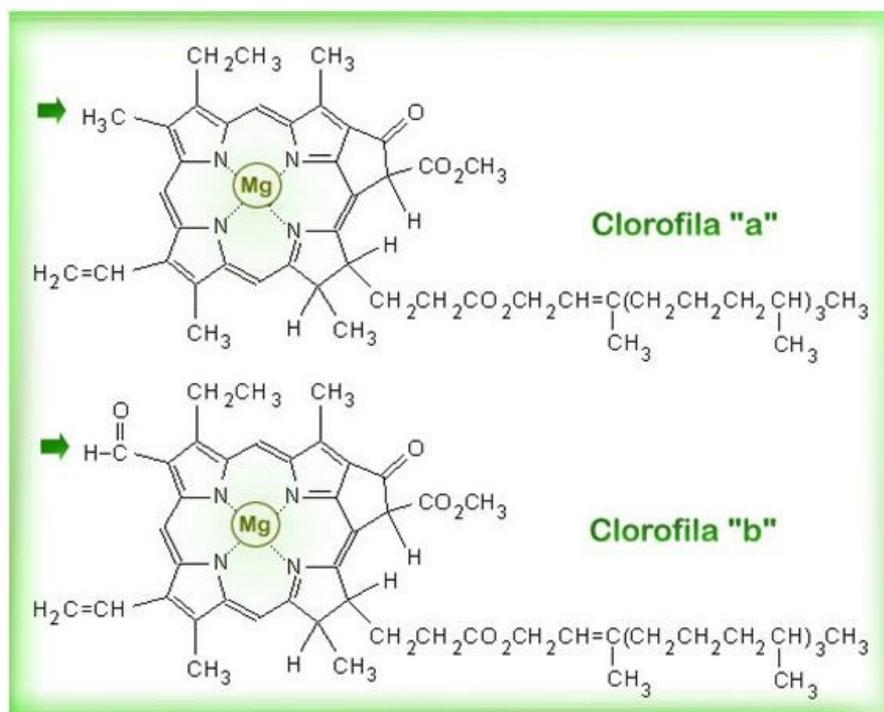
[...] Normalmente, menos de 50% do nitrogênio aplicado sob a forma de fertilizante é utilizado pelas culturas. As perdas no solo são devido aos inúmeros processos aos quais o nitrogênio está sujeito. O nitrogênio é perdido principalmente pela lixiviação de nitrato, volatilização de amônia e emissão de N_2 , N_2O e outros óxidos de nitrogênio [...] (ANGHINONI, 1986).

A eficiência na utilização do nitrogênio pela planta considera os aspectos de absorção e metabolização deste elemento. Com isso é importante monitorar os teores de nitrogênio presentes nas plantas por meio de metodologias confiáveis e

seguras quanto a sua precisão, rapidez e eficiência em quantificar e demonstrar com precisão a realidade do campo, a fim de se obter melhor eficiência na produtividade.

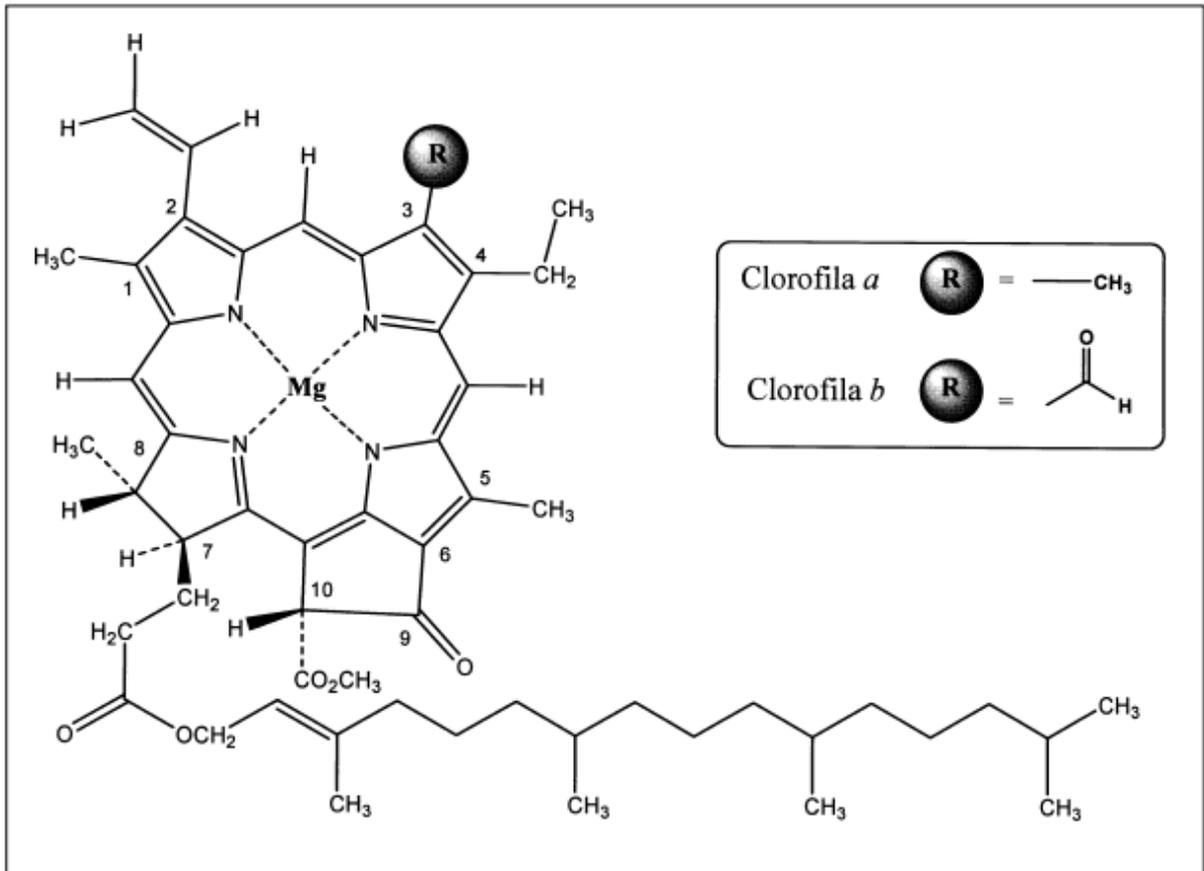
É importante salientar sua importância lembrando que o nitrogênio participa da síntese de vitaminas, hormônios, coenzimas, alcaloides, hexosaminas e outros compostos. Sendo que nas folhas das plantas o nitrogênio se encontra nos cloroplastos, compondo as moléculas de clorofila, onde cada átomo de magnésio está ligado a quatro átomos de nitrogênio (SOARES, 2013).

Figura 1 - Estrutura química da clorofila a e clorofila b



Fonte <https://www.infoescola.com/plantas/clorofila/>

Figura 2 – Detalhamento das principais diferenças das clorofilas a e b.



Fonte: (STREIT et. al, 2005).

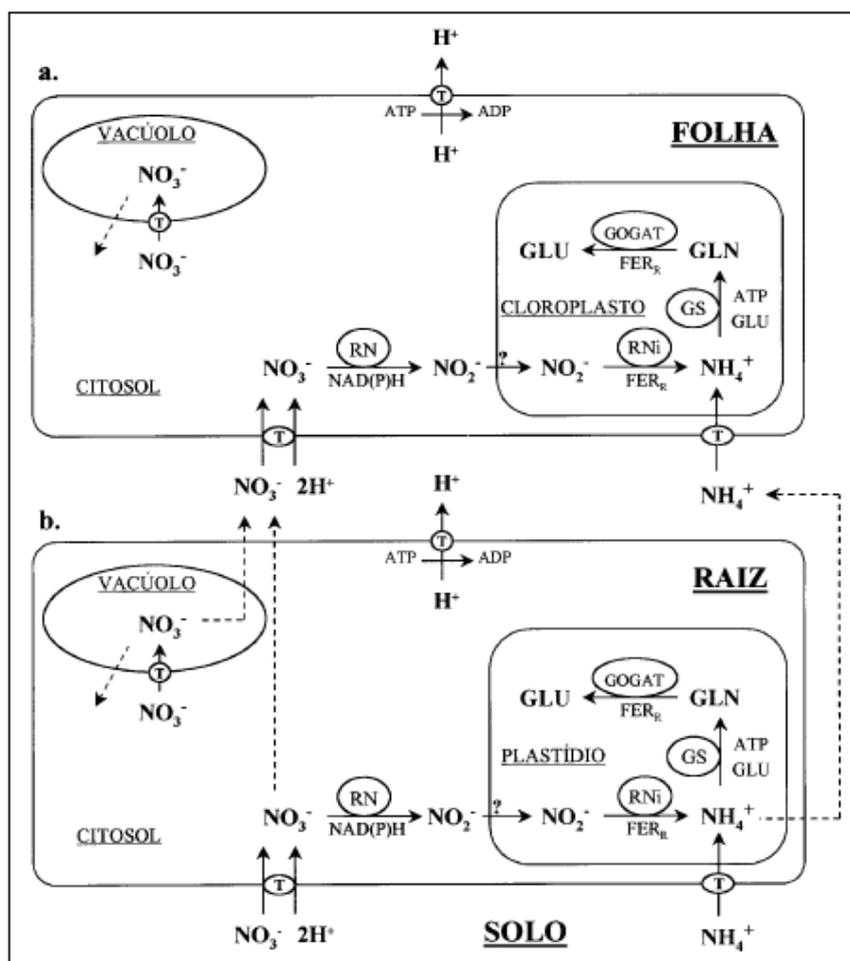
Como se pode observar acima as clorofilas a e b se diferem nos substituintes de carbono C-3. Na clorofila a, o anel de porfirina contém um grupo metil (-CH₃) no C-3 e a clorofila b (considerada um pigmento acessório) contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil-CH₃ (STREIT et. al, 2005).

A absorção e a assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas acontecem quando se tem a passagem de nitrato (NO₃⁻) e amônio (NH₄⁺) pelo meio da membrana plasmática das células da epiderme e do córtex da raiz, esse processo acontece por intermédio de transportadores específicos para essas formas de nitrogênio (BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, 2000 apud LARSSON & INGEMARSSON, 1989).

A figura 3 abaixo mostra que após a sua entrada na célula, o nitrato pode ser reduzido a nitrito (NO₂⁻), no citosol, por meio da enzima redutase do nitrato (RN) e, em seguida, convertido a amônio (NH₄⁺) no plastídio, através da enzima redutase do

nitrito (RNi). O amônio é, então, incorporado em aminoácidos pelas enzimas sintetase da glutamina (GS) e sintase do glutamato (GOGAT), formando glutamina (GLN), glutamato (GLU) e outros aminoácidos e seus metabólitos (BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, 2000 apud CRAWFORD, 1995).

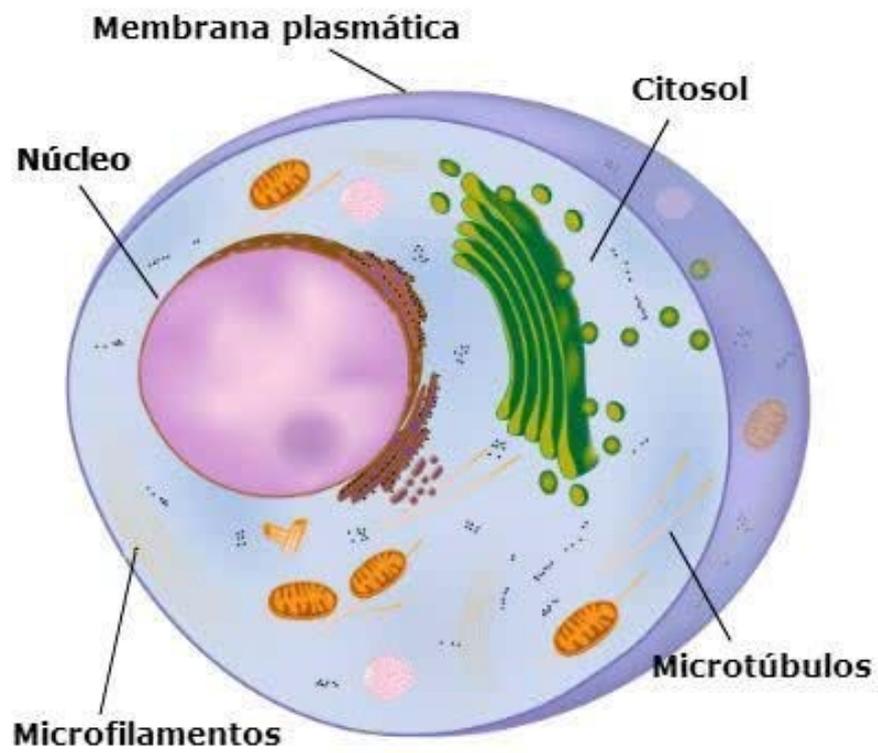
Figura 3 - Representação da rota de assimilação do nitrogênio nas raízes e folhas de plantas.



Fonte: (BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, 2000).

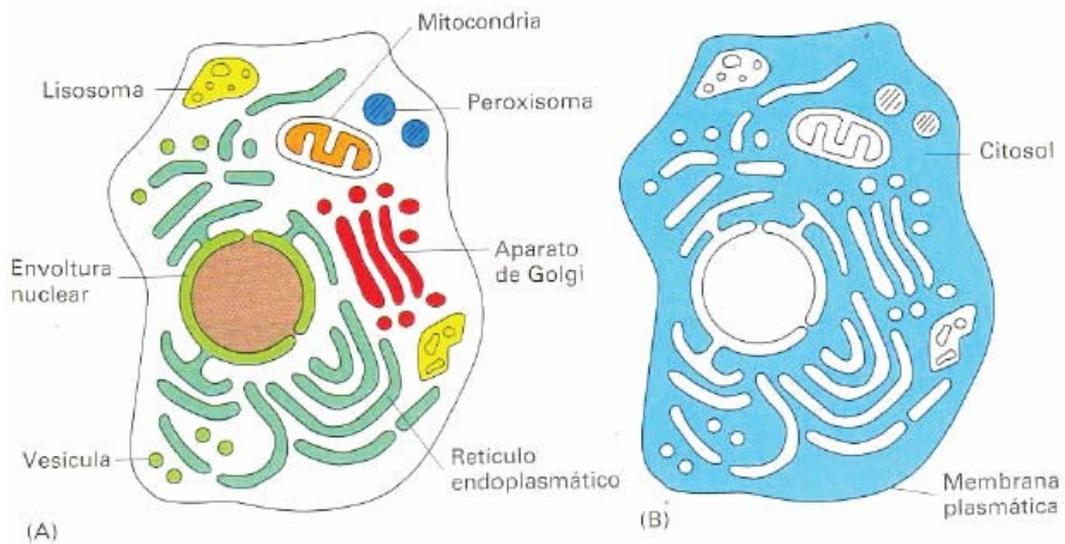
O nitrato (NO_3^-) e o amônio (NH_4^+) alternando entre si podem ser transportados por carregadores específicos por meio do tonoplasto e armazenados no vacúolo, para posteriormente serem reduzidos no citosol da mesma célula ou serem deslocados sem alterações para a parte aérea da planta (BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, 2000).

Figura 4– Representação da molécula de Citosol



Fonte: <https://www.todamateria.com.br/citoplasma/>

Figura 5 - As organelas intramembranasas distribuídas por todo o citoplasma.



Fonte: <https://www.blogdebiologia.com/estructuras-citoplasmaticas.html>

Nos colmos e folhas, o nitrato (NO_3^-) é reduzido a nitrito (NO_2^-) pela ação da enzima redutase do nitrato (RN), e a amônio, através da enzima do nitrito (RNI). O amônio (NH_4^+) é então incorporado em aminoácidos pelas enzimas GS e GOGAT. Estes elementos também são armazenados no vacúolo das células para posterior redução e utilização (BREDEMEIER, MUNDSTOCK, 2000 apud KING et al., 1993; CRAWFORD, 1995).

A quantidade de nitrogênio absorvida pela planta varia de acordo com o ciclo de desenvolvimento da mesma em função da quantidade de raízes e da taxa de absorção da raiz. Normalmente, essa quantidade aumenta progressivamente durante o período de crescimento vegetativo, atinge o máximo durante os estágios reprodutivos e cai na fase de enchimento dos grãos (BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, 2000).

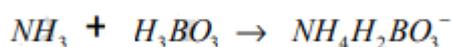
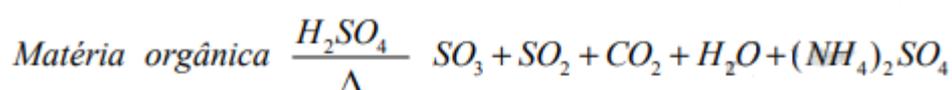
A absorção do nitrogênio compreende os processos de redução do nitrato a amônio e a incorporação do amônio em aminoácidos. A taxa e a quantidade de nitrogênio absorvido pelas plantas durante o seu ciclo dependem da atividade das enzimas envolvidas no ciclo do nitrogênio e da disponibilidade de energia necessária para esses processos (BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, 2000).

Os esforços das pesquisas para aumentar a eficiência na utilização de nitrogênio pelas plantas estão voltados, principalmente, aos estudos da eficiência das enzimas e suas formas envolvidas no ciclo do nitrogênio na planta e à identificação dos transportadores de nitrogênio presentes na membrana plasmática das células. A manipulação dos transportadores de nitrato e amônio abre uma perspectiva de atuação diretamente no processo de absorção do nitrogênio pela planta, visando obter plantas mais eficientes na utilização do nitrogênio disponível no solo.

Esta revisão aborda a importância do método de Kjeldahl e sua aplicação na agricultura, e discute as principais diferenças dos métodos analíticos químicos para a determinação de Nitrogênio, visando abordar a atual situação da pesquisa e aplicabilidade direcionadas a se obter um aumento da eficiência nas determinações de nitrogênio, aplicados a correção da fertilidade de solos e nutrição de plantas (BREDEMEIER E MUNDSTOCK, 2000).

O método em discussão se baseia na transformação do nitrogênio presente na amostra em sulfato de amônio por meio da digestão com ácido sulfúrico, e em seguida a destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada (MAPA, 2013), conforme seguem as reações abaixo:

Figura 6 – Reações que ocorrem nas etapas de digestão, destilação e titulação de nitrogênio pelo método Kjeldahl



Fonte: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iaq/met-poa-11-02-proteinas.pdf>

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo fazer uma revisão na literatura sobre a importância da metodologia de Kjeldahl do ponto de vista químico, assim como destacar sua importância e seu campo de aplicação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Explorar o histórico do método de Kjeldahl;
- Contextualizar o emprego e comparar a metodologia mencionada, com os demais métodos encontrados na literatura;
- Avaliar as vantagens e desvantagens no uso do método de Kjeldahl;
- Analisar estudos que empregaram o método de Kjeldahl na análise foliar voltada para estudos na área da agricultura.

3 METODOLOGIA

O estudo foi realizado por meio de uma pesquisa bibliográfica, considerando a importância do tema, e assim atender os objetivos propostos.

Para o desenvolvimento da pesquisa e ampla compreensão do tema, este Trabalho de Conclusão de Curso foi elaborado a partir dos registros, análises e organização dos dados bibliográficos, instrumentos que permitem uma maior compreensão e interpretação crítica das fontes obtidas, buscando conhecer e reunir informações sob a perspectiva das pesquisas de alguns autores.

A elaboração da revisão teve como principal ferramenta a pesquisa fundamentada em materiais publicados sobre o tema; como livros, artigos científicos, publicações periódicas e materiais disponíveis nas bases Web of Science, NCBI e Google Acadêmico, com base nestes bancos de dados conceituados na área científica, foram realizadas as etapas e procedimentos onde se busca a identificação preliminar bibliográfica que abrange o período de 1904 à 2018, catalogação e

organização dos dados, análise e interpretação das fontes, bibliografia, revisão e relatório final.

Pode-se dizer que a revisão bibliográfica é o emprego de técnicas e procedimentos científicos que limitam ou dão direção para a seleção de artigos (PERISSÉ, 2001). Com isso pretende-se relacionar ao significativo resultado que um levantamento pode ser aplicado com intervenções informativas e educativas, para a contribuição da pesquisa ao profissional químico, assim como, explanar sobre o método de Kjeldahl, suas aplicações e efeitos, analisando estudos que o empregaram e os resultados obtidos nesses estudos.

Em relação à grande importância da revisão bibliográfica, estudiosos afirmam que essa metodologia de estudo, pode criar uma sólida base de conhecimentos, capaz de guiar a prática profissional e identificar a necessidade de novas pesquisas no ramo da atividade estudada (SAMPAIO, MANCINI, 2018). Segundo Fogliatto e Silveira (2007), a revisão bibliográfica, é aquela que reúne idéias provenientes de diferentes fontes, objetivando incorporar uma nova teoria ou uma nova forma de apresentação para um assunto.

Esse tipo de revisão é caracterizado como um método que integra vários resultados obtidos de pesquisas sobre o mesmo assunto, com o objetivo de abreviar e reduzir esses conteúdos, analisando esses dados para desenvolver uma explicação mais ampla de um determinado fenômeno, é a forma mais abrangente de pesquisa e revisão, devido à integração de diversos estudos experimentais e não experimentais e questões teóricas e/ou empíricas (COOPER, 1989).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HISTÓRICO

O método de Dumas foi desenvolvido em 1831 pelo químico francês Jean Baptiste Dumas e foi o primeiro método descrito para análise de nitrogênio e proteína. Na época não havia muitas condições de realizá-lo, pois a tecnologia era limitada. O método é realizado utilizando temperaturas elevadas ocasionando

oxidação total da amostra na presença de oxigênio, reduzindo os óxidos de nitrogênio fazendo com que ocorra a detecção do nitrogênio molecular produzido. Apenas um equipamento é utilizado onde acontecem à combustão, redução, separação e detecção, não sendo utilizados reagentes perigosos. Para a determinação de nitrogênio é necessária pouca quantidade de amostra e o resultado é apresentado, entre 4 e 10 minutos (VIEIRA, et. al, 2016).

O método Kjeldahl, foi criado em 1883 por um dinamarquês chamado Johan Kjeldahl, como já dito antes, com o passar dos anos o método sofreu algumas modificações, mas hoje é o mais utilizado. Esta análise acontece basicamente em três etapas: digestão, destilação e titulação, levando algumas horas para apresentar os resultados. A amostra é digerida com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento, transformando todo o nitrogênio orgânico em íons amônio. Na etapa subsequente a solução obtida é alcalinizada com hidróxido de sódio concentrado e a amônia produzida nessa etapa é destilada e captada por uma solução de ácido bórico, que então é titulada com ácido padronizado (VIEIRA, et. al, 2016).

Claro que em ambos os métodos existem vantagens e desvantagens, como por exemplo, o método de Dumas pode não apresentar elevada confiabilidade nos resultados, pois podem ocorrer divergências devido a baixa quantidade de amostra utilizada, mas atualmente ele vem ganhando destaque pela agilidade e produtividade por análise. O método de Kjeldahl é mais tradicional, utilizando maiores quantidades de amostra e por este motivo apresenta menor chance de erros (VIEIRA, et. al, 2016).

É importante salientar que independente do método a ser trabalhado ou tipo de material a ser digerido, a temperatura de digestão e o tipo de catalisador empregado são considerados fatores críticos para a velocidade da digestão e recuperação completa de nitrogênio (GIBSON, 1904).

Ambos métodos são considerados válidos e reconhecidos pelas principais organizações internacionais deste meio e a opção de utilização de um ou outro, depende principalmente das condições e da disponibilidade de equipamento, mão de obra qualificada e tempo para realização da análise (VIEIRA, et. al, 2016).

Durante a sua experiência no laboratório de Barfoed, Kjeldahl estava interessado no desenvolvimento de métodos analíticos para sua pesquisa sobre

proteínas e enzimas. Não é possível estabelecer precisamente quando Kjeldahl concebeu seu método para nitrogênio total e começou a trabalhar nele. Mas os registros do Laboratório Carlsberg indicam que ele estava trabalhando nisso em outubro de 1882 (GIBSON, 1904).

Segundo Gibson (1904) os métodos de Dumas, e de Warrentrapp e Wil eram considerados entediantes e demorados nas análises. O método de Dumas é relativamente conhecido, mas os princípios de Warrentrapp e Will não são tão bem conhecidos.

Numerosos pesquisadores procuraram métodos simples de digestão úmida de amostras para determinação de nitrogênio, no entanto, nenhum avanço real veio até o trabalho de Kjeldahl (GIBSON, 1904).

O mesmo fez a importante e simples descoberta de que o nitrogênio total em praticamente todos os materiais em que ele estava interessado poderia ser determinado aquecendo o material em ácido sulfúrico concentrado, oxidando quantitativamente para bissulfato de amônio. No entanto, ele achou necessário em alguns casos, para completar a oxidação, fazer a adição de permanganato de potássio em pó como oxidante auxiliar (MCKENZIE, 1994).

O trabalho original de Kjeldahl forneceu uma melhoria para a determinação do nitrogênio total em relação à velocidade, precisão e exatidão. No entanto, houve um curto período entre a publicação do pesquisador citado e a aparição de publicações efetuando melhorias adicionais. O primeiro e mais óbvio motivo para efetuar melhorias foi à adição de catalisadores para acelerar o processo de oxidação. Esse processo envolveu vários catalisadores de metal e mercúrio. A segunda abordagem envolveu a adição de sais como sulfato de potássio. Estas duas abordagens, juntamente com a adição de oxidantes continuam sendo à base da maioria das propostas para modificações do procedimento original de Kjeldahl (GIBSON, 1904). Ao avaliar os estudos com emprego de catalisadores é importante reconhecer que os mesmos devem ser avaliados devido a alta temperatura de digestão, tanto para acelerar a digestão, quanto para o efeito na decomposição pirolítica para nitrogênio. Com o aprofundamento das pesquisas sobre o método desenvolvido por Kjeldahl houve progressos no uso de temperaturas mais altas de

digestão e a introdução do equipamento no qual levou o seu nome, utilizado para a determinação de nitrogênio (MCKENZIE, 1994).

No decurso da digestão, deve ter-se cuidado com o aumento da temperatura durante a digestão a tal ponto, para que não ocorra uma perda significativa de nitrogênio. A situação torna-se complexa para materiais como alimentos, plantas, fertilizantes, etc., onde pode haver quantidades apreciáveis de lipídios e carboidratos presentes. O consumo de ácido sulfúrico em sua oxidação pode ocorrer a tal ponto que exista um aumento considerável da temperatura devido ao aumento na relação de catalisador e ácido sulfúrico. Com essa questão a ser resolvida, emprega-se a oxidação preliminar com um oxidante auxiliar (por exemplo, peróxido de hidrogênio) para oxidação rápida de lipídeos e carboidratos e assim evitar o consumo excessivo de ácido sulfúrico. Outro problema é encontrado em materiais contendo ligações N-N e N-O e estas podem exigir pré-tratamento (GIBSON, 1904).

4.2 EMPREGABILIDADE DO MÉTODO KJELDAHL NA CIÊNCIA

Como se sabe esse método é bem conhecido e vem sendo aplicado em diversos estudos e pesquisas, trazendo cada vez mais informações quanto a sua facilidade benéfica em reproduzi-lo e quanto a sua qualidade e aplicabilidade, como será tratado a seguir.

4.2.1 Importância da análise de nitrogênio empregada na análise bromatológica

A composição bromatológica é considerada um dos principais parâmetros utilizados para medir o valor nutritivo de uma forragem, ou seja, é uma forma de se avaliar a composição química de um determinado material (alimento, plantas, rações e demais) (MOREIRA et. al, 2017).

As proteínas são um grupo de substâncias fundamentais presentes em alimentos e participantes de diversas reações metabólicas indispensáveis em processos biológicos vegetais ou animais. Ela é composta principalmente por

nitrogênio, que estão presentes constituindo-a na forma de aminoácidos e compostos nitrogenados (VIEIRA, et. al, 2016).

Atualmente, o método de Kjeldahl é o mais utilizado para a determinação de nitrogênio e conteúdo protéico em alimentos e rações, essa vasta aplicabilidade se deve graças ao alto nível de precisão, reprodutibilidade e simples aplicação do método em análises de nitrogênio total (VELP, 2018).

No trabalho desenvolvido por Santos, Moura, Camara (2011), empregou-se a metodologia de Kjeldahl para a determinação quantitativa de proteínas no mel, a importância dessa determinação se dá pelo fato dessas reações indicarem adição de substâncias proteicas ou perdas durante o processamento, indicando possíveis fraudes em mel.

Na pesquisa desenvolvida por Scarlato, et. al (2016), empregou-se o método de Kjeldahl para avaliar os teores de proteínas, em amostras de Whey protein de diferentes marcas e lotes, em comparação com os respectivos rótulos, ao fim da avaliação o mesmo concluiu que de quinze amostras, duas não atenderam aos valores expressos no rótulo, considerando-se o limite de tolerância previsto pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Indicando assim a importância do emprego da metodologia de Kjeldahl.

No trabalho de Santos, et. al (2017), o mesmo empregou o método de Kjeldahl para a determinação de proteína, o presente estudo tratou-se de determinar a composição da farinha de casca de abacaxi, com a finalidade de conhecer seu valor nutricional.

Segundo o estudo proposto por Saggin (2017), empregou-se a metodologia de Kjeldahl para a quantificação de proteínas em amostras de vegetais, buscando avaliar as perdas de nutrientes com os processos de congelamento e branqueamento, muito utilizados nas indústrias alimentícias a fim de conservar os alimentos. Na avaliação apresentada por Ferreira (2017), em amostras de açaí comercializadas nas feiras de São Luiz foi possível verificar novamente o emprego da metodologia para determinação de nitrogênio, no qual apresentou concordância com a literatura de referência da pesquisa.

Gomes et. al (2018), avaliou a qualidade da água subterrânea, por meio de monitoramento de parâmetros físico-químicos e microbiológicos em poços de monitoramento existentes em áreas de cana-de-açúcar irrigadas com vinhaça.

E neste trabalho empregou-se a metodologia para a determinação de nitrogênio total semestralmente no período de 2009 a 2012. E através da avaliação aplicada foi constatado que os poços se diferenciam pelo período chuvoso e seco, sugerindo que os parâmetros avaliados de qualidade da água estão sendo influenciados pela aplicação de vinhaça.

Além disso, tem-se a diagnose foliar, que é um método em que se analisam os teores dos nutrientes nas folhas, em alguns períodos definidos da vida da planta, avaliando essas informações e comparando com padrões nutricionais de referência, sendo o nitrogênio o principal nutriente a ser utilizado em correções, devido a sua grande importância ao desenvolvimento da planta. Para verificar como estão os níveis de nutrientes da planta deve-se fazer a coleta da folha, pois são nelas que ocorrem os principais processos metabólicos, portanto, é o órgão que melhor representa o estado nutricional da planta (FAQUIN, 2002).

A análise de nitrogênio total de tecido vegetal geralmente é realizada pelo método de Kjeldahl, através do qual a amostra é digerida com ácido sulfúrico concentrado sob aquecimento contínuo, o que faz com que todo o nitrogênio orgânico se converta em íon amônio. Na etapa posterior, a solução obtida é alcalinizada com hidróxido de sódio concentrado, e com isso a amônia produzida nessa etapa é destilada em equipamento específico e captada por uma solução de ácido bórico, que finalmente é então titulada com ácido de concentração conhecida e padronizada (SOARES, 2013).

Assim como em vários campos da agricultura, a análise de solos, plantas e alimentos prontos para consumo humano ou animal, é uma forma de tentar representar uma grande área a ser cultivada, ou um grande lote de produtos para ser comercializados, e por isso a amostragem e todas as determinações, devem ser bem minuciosas para garantir a qualidade em todas as etapas do processo.

4.2.2 Importância do Nitrogênio na Agricultura

O nitrogênio é um nutriente que é responsável pelo funcionamento de vários processos fisiológicos que ocorrem nas plantas, como a fotossíntese, respiração, crescimento, desenvolvimento e atividade das raízes, assim como a absorção iônica de outros nutrientes, portanto, além de ser constituinte dos aminoácidos livres e proteicos, o nitrogênio está presente em outros compostos importantes, como as bases nitrogenadas (purinas e pirimidinas), os ácidos nucleicos (DNA e RNA) (SOARES, 2013).

A maior parte das plantas terrestres utiliza o nitrato como principal fonte de nitrogênio. O nitrato também atua como uma importante molécula indicadora dos processos fisiológicos vitais necessários para o crescimento e desenvolvimento ideal das plantas. Melhorar essa absorção e o transporte de nitratos melhoraria o crescimento das plantas, resultando em melhores colheitas. A crescente desmobilização de nitrato e compostos nitrogenados assimilados, da fonte ao coletor, favorece a maior produtividade e qualidade (Kant, 2017).

Em um estudo proposto por Li, et. al (2017) observou-se que a absorção de nitrogênio pelas plantas foi bastante importante, pois diminuiu a quantidade de nitrogênio disponível no solo e, portanto, aumentou a limitação de nitrogênio para microrganismos. Com isso a fertilização diminui e acaba diminuindo a decomposição da matéria orgânica do solo, aumentando a eficiência de carbono no solo.

Segundo o trabalho desenvolvido por Almeida et. al (2016), na região do Acre, no qual teve como objetivo comparar dois métodos convencionais de Kjeldhal e a espectroscopia do infravermelho próximo na determinação do teor de nitrogênio nos solos da bacia do Acre. Foram utilizadas 176 amostras de solos representativas da bacia do Acre das quais se determinou os teores de N pelos métodos convencionais de Kjeldahl e o método elementar. Para avaliação da aplicabilidade do NIR adotou-se como referência os teores determinados pelo método elementar. Ao comparar as médias de nitrogênio pelos métodos Kjeldahl e elementar não houve diferenças segundo o estudo. Adotando-se os teores determinados pela análise elementar para calibrar e depois validar as estimativas do nitrogênio no solo pela espectroscopia do infravermelho próximo, pode-se concluir que diante dos resultados encontrados foi

interpretado que há potencial da espectroscopia do infravermelho próximo para ser usado apenas na quantificação do teor de nitrogênio no solo em estudos expedidos que demandam grande volume de processamento de dados.

No trabalho desenvolvido por Silveira, et. al (2015), fez-se uma avaliação da qualidade da forragem de azevém nativo em relação a níveis crescentes de adubação nitrogenada, avaliando o teor de proteína, pela determinação de nitrogênio foliar. Os resultados alcançados concluíram que a adubação nitrogenada em forma de ureia proporcionou aumento crescente na matéria seca (MS) da pastagem, assim como também houve aumento no teor de nitrogênio da pastagem proporcionalmente ao aumento dos níveis de adubação.

4.3 PROPRIEDADES DO MÉTODO KJELDAHL

A determinação do nitrogênio pode ser executada por meio da digestão sulfúrica seguida do método semimicro Kjeldahl ou até mesmo com a amostra sólida, no analisador elementar. Neste caso, é determinado o Nitrogênio total (SOARES, 2013).

O método é usualmente classificado em macro, semi-micro e micro Kjeldahl conforme a quantidade de amostra que vai ser submetida à digestão para análise (MAPA, 2013). Isso varia conforme o material a ser analisado, pois se é um material com teor alto de nitrogênio, uma pequena massa pode ser representativa, mas se o material tiver um teor baixo, pode ser que uma pequena massa não seja significativamente representativa, devendo utilizar a opção do macro Kjeldahl.

As principais limitações desse método para a determinação do teor de nitrogênio total em tecido vegetal são: demora na digestão das amostras que necessitam de aquecimento em bloco digestor; o uso de reagentes perigosos em concentrações elevadas; geração de grandes volumes de resíduos que necessitam de neutralização antes do descarte; possibilidade de perdas no sistema de destilação que pode resultar em erros e subestimação dos teores de nitrogênio (SOARES, 2013).

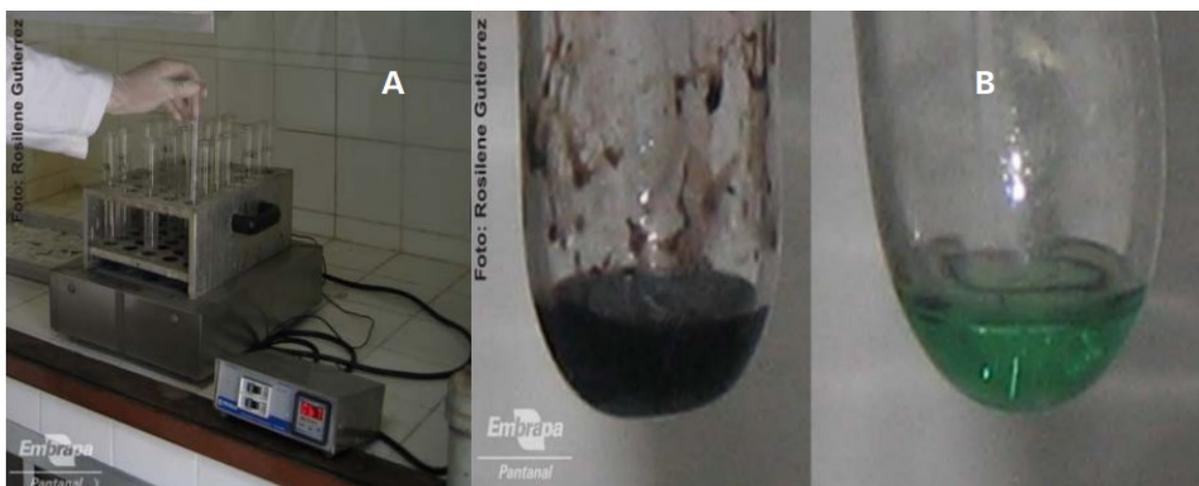
Considerando essas informações deve-se explicitar as etapas do processo de análise pelo método de Kjeldahl, visando justamente agregar as informações do

processo que se baseiam na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio por meio da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que posteriormente é fixada em solução ácida e titulada (MAPA, 2013).

Este método é dividido em três etapas principais: a digestão, destilação e a titulação, abaixo serão detalhadas as etapas mencionadas:

Na etapa da digestão ocorre o aquecimento da amostra com ácido sulfúrico concentrado até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados. Com a finalidade de aumentar a temperatura de ebulição do ácido e aumentar a velocidade de oxidação da matéria orgânica é adicionada à reação uma mistura catalítica. Durante a digestão, o carbono é transformado em dióxido de carbono (CO_2) e o hidrogênio em água (H_2O) (MAPA, 2013). Além disso, existe o nitrogênio sob a forma de amina, amida e nitrila, que é transformado em amônia (NH_3) na qual reage com o H_2SO_4 , formando o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) conforme mostrado nas reações, na figura abaixo, durante a digestão, e esse ao se resfriar pode formar cristais (GALVANI, GAERTNER, 2006).

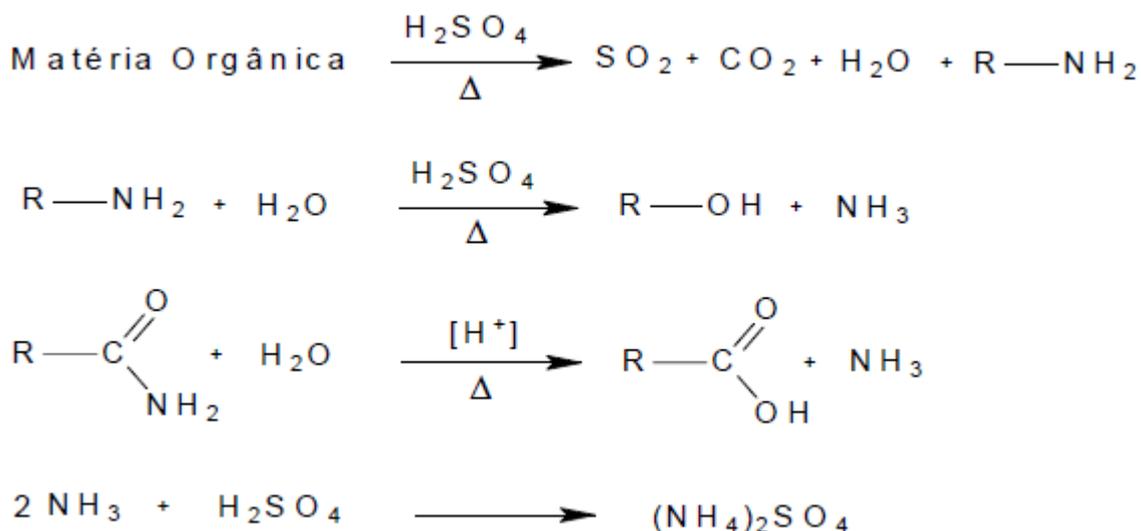
Figura 7 – (A) Digestão de amostras para a determinação de nitrogênio total. (B) Mudança de coloração da solução no processo da digestão.



Fonte: (GALVANI, GAERTNER, 2006)

Na etapa da destilação o objetivo é transformar o nitrogênio presente na solução na forma de sulfato de amônio (NH_4^+) para NH_3 gasoso. Com adição de NaOH concentrado e com o aquecimento, ocorre a liberação da amônia que é separada da mistura por destilação. O gás então reage com uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio (MAPA, 2013).

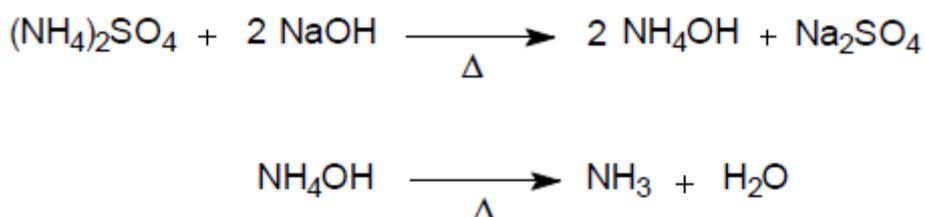
Figura 8 – Reações que ocorrem na etapa de digestão de Nitrogênio



Fonte: (GALVANI, GAERTNER, 2006)

Após a digestão, direciona-se a continuação do processo na etapa da destilação, que pode ser feita por aquecimento direto ou por arraste de vapor. O sulfato de amônio é tratado com hidróxido de sódio (NaOH), em excesso, ocorrendo a liberação de amônia (GALVANI, GAERTNER, 2006), conforme as reações abaixo:

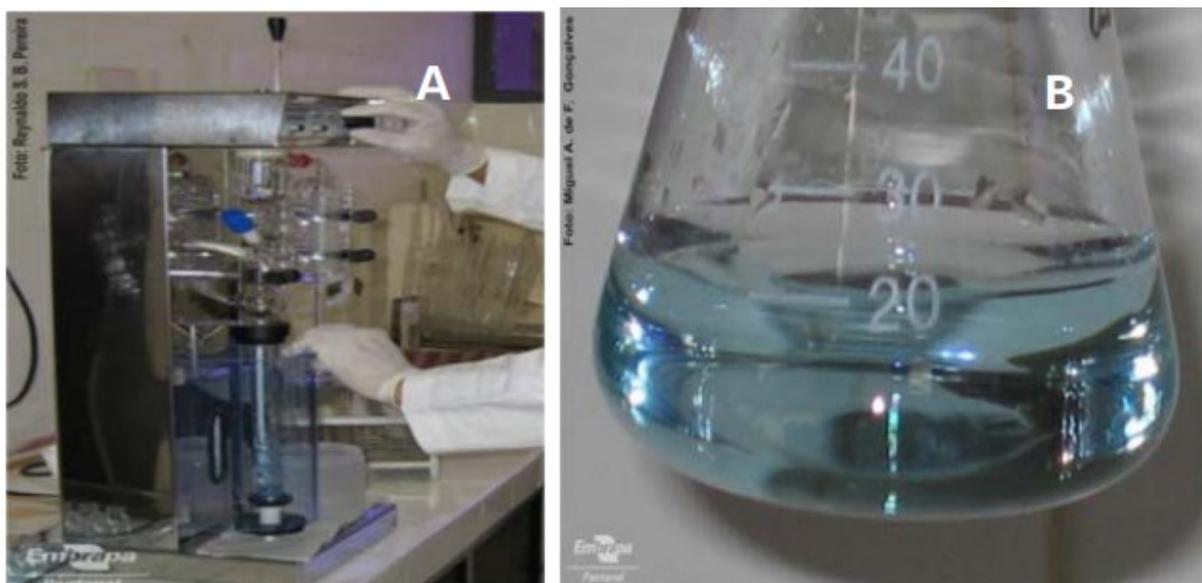
Figura 9 – Reações que ocorrem na etapa de destilação



Fonte: (GALVANI, GAERTNER, 2006)

Ao se adicionar o hidróxido de sódio, para garantir um ligeiro excesso de base, devem-se utilizar algumas gotas de solução indicadora, no destilador, pois a amônia que desprende na reação é coletada num frasco contendo ácido bórico (H_3BO_3) com o indicador, previamente acoplado ao conjunto da destilação (GALVANI, GAERTNER, 2006).

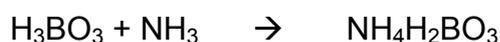
Figura 10 - (A) Processo de destilação. (B) Formação do borato de amônio.



Fonte: (GALVANI, GAERTNER, 2006)

Considera-se terminado o processo, quando toda a amônia já se desprende.

A solução contendo ácido bórico com o indicador que no início apresentava coloração rósea adquire cor verde/azulada, à medida que vai se formando o borato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$), conforme a reação que segue abaixo:



Já na terceira e última etapa, ocorre à titulação, que consiste na titulação do borato de amônio com uma solução de ácido sulfúrico ou de ácido clorídrico padronizada (HCl) de título conhecido até a viragem do indicador, conforme a reação abaixo:

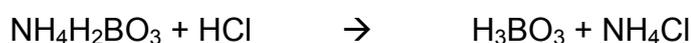
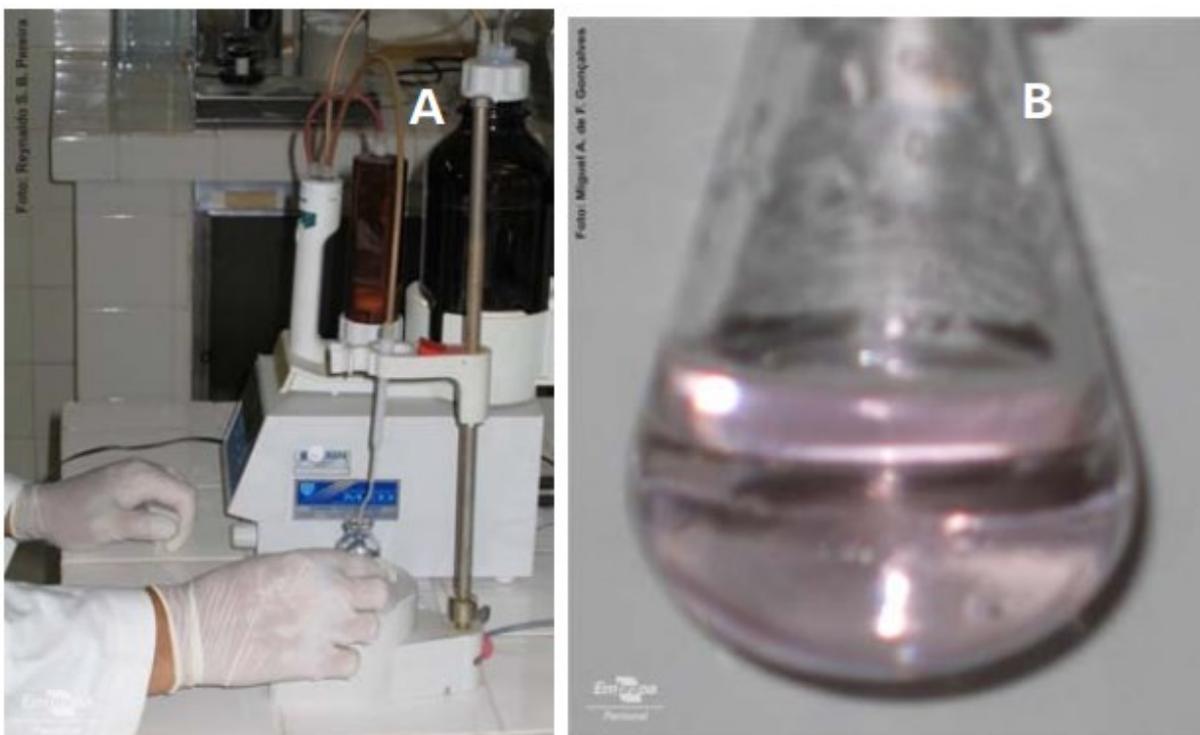


Figura 11 - (A) Titulação para a determinação da dosagem de nitrogênio. (B) Viragem na titulação para a determinação da dosagem de nitrogênio total.



Fonte: (GALVANI, GAERTNER, 2006)

É importante se observar que quanto maior o volume de ácido sulfúrico ou clorídrico gasto na titulação, maior a quantidade de nitrogênio presente na amostra.

4.3.1 Pré Tratamento

É importante observar que no caso de amostras em que o nitrogênio está na forma oxidada, como os nitratos e nitritos, é necessário efetuar um pré-tratamento antes da digestão da amostra. Neste caso os nitratos são reduzidos à amônia; a adição de ferro reduzido em meio ácido libera H^+ e reduz o NO_3^- à amônia; os nitritos são primeiramente oxidados com permanganato a nitrato e este é posteriormente reduzido à amônia com adição do ferro reduzido em meio ácido (FERREIRA, 2014).

O sulfato de potássio é adicionado ao ácido sulfúrico para elevar a temperatura de digestão. Os catalisadores usados normalmente para acelerar a reação são selênio, permanganato de potássio ($KMnO_4$), óxido de mercúrio (II)

(HgO) e sulfato de cobre (CuSO₄). Para promover a oxidação da matéria orgânica o agente oxidante mais usado é o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e tem mostrado ser melhor nas digestões que não requerem pré-tratamento da amostra (FERREIRA, 2014 apud Trivelin, 1973).

A mistura de ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio são empregados na digestão do tecido vegetal para a determinação de nitrogênio total ou proteína total, pois o ácido sulfúrico diluído tem baixo poder oxidante, com exceção do proveniente dos íons hidrogênio, que podem ser reduzidos a hidrogênio gasoso pela ação dos metais em solução. O ácido concentrado, por outro lado, quando aquecido, oxida muitos elementos, sendo ele próprio reduzido a SO₃, enxofre elementar ou H₂S. Quase todos os compostos orgânicos são parcialmente oxidados ou completamente destruídos pelo ácido concentrado a quente (FERREIRA, 2014 apud BOCK, 1979).

Por isso uma boa alternativa para a digestão na determinação do nitrogênio total em tecido vegetal é por meio da utilização de peróxido de hidrogênio, considerando que se trata de um dos agentes oxidantes mais usados e que têm demonstrado ser mais eficiente nos processos de digestão que não requer pré-tratamento da amostra (SOARES, 2013).

4.4 TÉCNICAS DE IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE NITROGÊNIO

Um estudo proposto por Galvani e Gaertner (2006), apresentou uma metodologia a fim de diminuir a quantidade de resíduos gerados, o consumo de reagentes e os custos para a determinação de nitrogênio total e proteína bruta pelo método Kjeldhal. Neste estudo foram empregados forrageiras de várias espécies, e foi verificado que as alterações nas quantidades propostas dos reagentes neste método não influenciaram significativamente nos resultados e na precisão do mesmo, com isso esta metodologia passou a ser adotada como análise padrão pela Embrapa Pantanal para a determinação de nitrogênio total e proteína bruta de tecidos, produtos e subprodutos de origem animal e vegetal.

Silva, et. al (2016) desenvolveu um trabalho no qual avaliou a influência de diferentes condições de preparo de amostra para a determinação de nitrogênio total em tecido foliar. O estudo considerou três condições diferentes, sendo a primeira

uma mistura catalítica a base de selênio e sulfato de potássio em meio ácido. A segunda utilizou-se uma mistura composta por sulfato de cobre e sulfato de potássio, em meio ácido. Na terceira repetiram-se os reagentes do segundo método, porém trabalhou com quantidades menores de reagentes. Neste estudo os resultados obtidos pelos três métodos, de acordo com o teste de t, não existem diferenças estatística entre a média das variáveis. Desta forma Silva et. al (2016) conclui que o terceiro método é o mais indicado, já que emprega menor quantidade de reagentes na determinação, reduzindo os custos e a geração de resíduos químicos.

Um método foi desenvolvido por Yasuhara, E Nokihara, (2001) para determinação do teor total de nitrogênio. O método envolve a decomposição de amostras, seguido por aprisionamento e colorimetria quantitativa com determinação da amônia resultante. Foi desenvolvido um equipamento para realizar a rotina de análises de amostras múltiplas, embora o autor explicita que é econômico e ambientalmente correto o mesmo utiliza fenol, hidróxido de sódio e hipoclorito de sódio, ambos bem diluídos.

No caso de Rodrigues, Silva e Detmann (2018), avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de hidróxido de sódio na etapa de destilação sobre os resultados de nitrogênio total obtidos pelo método de Kjeldahl em diferentes materiais, com diferentes teores, e padrões com resultados conhecidos, esse processo foi repetido por vários dias. E a variação na concentração de hidróxido de sódio não afetou a repetibilidade dos resultados, com isso os autores concluíram que concentrações de hidróxido de sódio de 300 a 600 g/L na solução empregada na etapa de destilação do método de Kjeldahl propiciam recuperação completa do N com padrão de precisão similar.

Ao finalizar o experimento concluíram que o método é confiável, rápido, econômico, com sistema analítico quantitativo sensível e reproduzível para determinação do teor de nitrogênio, enfatizando que o método não requer capelas de exaustão (YASUHARA, NOKIHARA, 2001).

4.5 COMPARATIVO DOS PRINCIPAIS MÉTODOS E SUAS EFICIÊNCIAS

A escolha do método a ser empregado na digestão de amostras depende de diversos fatores, como quais os objetivos do estudo, dos elementos ou compostos a serem analisados, e primordialmente levando em consideração as potencialidades do laboratório, da capacidade, do custo e da segurança operacional necessária para a execução do mesmo (SOARES, 2013).

Na escolha do método deve-se lembrar de que alguns dos catalisadores utilizados na preparação da mistura digestora (digestão sulfúrica) têm alto custo de aquisição como, por exemplo, o selenito de sódio, contudo, exerce importantes funções no processo de digestão, acelerando a reação, diminuindo a energia de ativação, diminuindo a energia do complexo ativado, isso sem ser consumido durante esse processo (SOARES, 2013).

Trabalhos que empregaram a determinação de nitrogênio total em solos tropicais mostraram que o tempo para mineralização completa da amostra pode ser reduzido em até 30 minutos com a adição de 25 mg de selênio à mistura digestora, por outro lado, para a digestão com o peróxido de hidrogênio de acordo com o estudo de Malavolta (1997), é empregado 1 ml de ácido sulfúrico por amostra, ou seja, para se determinar o nitrogênio total em 143 amostras de tecido vegetal são gastos 143 ml de ácido sulfúrico, enquanto que para se analisar a mesma quantidade de amostras pela digestão sulfúrica são gastos 200 ml de ácido sulfúrico para preparar a solução da mistura digestora.

O método Kjeldahl para determinação de nitrogênio total tem sido utilizado há bastante tempo e apresenta como principal vantagem o uso de uma aparelhagem bastante simples, com baixo custo e fácil manuseio (SOARES, 2013).

No estudo aplicado por Soares (2013), pode-se perceber que para a determinação de nitrogênio total em alface (cultivar Vera) não houve diferença significativa entre os resultados obtidos comparando-se os resultados encontrados no método de nitrogênio total tanto pela digestão sulfúrica como pela digestão com peróxido de hidrogênio.

Segundo Costa e Leal (2018), ao comparar os métodos de Kjeldahl e Dumas para a determinação de Nitrogênio Total, em algumas amostras de tecido Vegetal e

grãos analisados na rotina de laboratório, tiveram resultados de teores de nitrogênio total obtidos pelo método de Dumas um pouco maiores que os obtidos pelo método de Kjeldahl. Isso se deve ao fato da maior recuperação do nitrogênio presente na amostra pelo método de Dumas. Segundo os autores, essa tendência foi observada em outros trabalhos. Porém avaliando as variações dos resultados do ponto de vista estatístico, não se pode considerar que houve diferença significativa entre os dois métodos.

Com isso pode-se dizer que em termos práticos ambos os métodos podem ser utilizados para determinações de nitrogênio total em amostras de tecido vegetal.

O método de Kjeldahl tem como vantagem o custo, porém é um ensaio que demanda um tempo maior. O método de Dumas possui a vantagem do tempo de execução, porém a desvantagem é o custo da análise que pode chegar ao dobro do custo da análise pelo método de Kjeldahl (COSTA E LEAL, 2018).

5 CONCLUSÃO

A análise química do solo é uma das ferramentas mais eficientes e seguras que os técnicos e os produtores dispõem para a avaliação da capacidade do solo em fornecer nutrientes às plantas, recomendar e corrigir se necessário e, assim, garantir a prevenção de problemas nutricionais nas plantas. Mas a análise da planta pode representar uma integração de todos os fatores que afetam a disponibilidade dos nutrientes no solo e o estado nutricional da cultura (FAQUIN, 2002).

O maior interesse em correção e aplicação para a planta fica para o nitrogênio, e para os micronutrientes, considerando a carência de informações dos teores de referência destes nutrientes e padronização da metodologia analítica. Principalmente em plantas perenes, onde a análise da planta pode dar informações importantes para um ajuste no plano de adubação (FAQUIN, 2002).

Dessa maneira, deve-se pensar em aliar as análises utilizadas no meio da agricultura, aliando as correções de solo com a análise da planta, e usá-las nos seus diferentes métodos, sendo uma complementar a outra. O uso da análise da planta pode representar grande economia de fertilizantes e ganhos na produção.

Nesse sentido, o emprego de metodologias eficientes para a determinação de nutrientes importantes como o nitrogênio é de extrema importância. Dessa forma, a

metodologia de análise de nitrogênio pelo método de Kjeldahl demanda menor custo, e garante uma boa qualidade e confiabilidade nos resultados quando aplicada a análise foliar. A união de todas essas características faz com que o método de Kjeldahl seja amplamente empregado na agricultura, e em várias outras áreas da ciência, na determinação de nitrogênio.

Por se tratar de uma metodologia que vem sendo empregada e amplamente difundida nas análises de nitrogênio, no campo prático e científico, há mais de 130 anos, deve-se considerar o tamanho da sua importância, e considerar também como esse método é representativo frente a tantas pesquisas hoje conhecidas, que se utilizaram dessas técnicas para obter tantas informações que são hoje acessíveis, graças a esse importante trabalho que até hoje tem uma larga escala a ser aplicado.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.A.V; SILVA, L.M; MARCHÃO, R. L; WADT, P.G.S; SOUZA, A.M; OLIVEIRA, L.C. **Métodos Kjeldahl, elementar e o potencial da espectroscopia do infravermelho próximo para determinação de nitrogênio em solos da bacia do Acre.** Biota Amazônia. Macapá, v.6,n.8, p.38-43, 2016.

BREDEMEIER, C; MUNDSTOCK, C. M.. **Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas.** Ciencia Rural. vol.30, n.2, pp.365-372, 2000.

COOPER, H.M. **Integrating Research: a guide for literature reviews.** 2. ed. London SAGE publication. v.2, p.155, 1989.

COSTA, D. A. S.; LEAL, W. G. O.. **Análise de nitrogênio total em amostras de tecido vegetal pelos métodos de Dumas e Kjeldahl.** 5º Seminário Jovens Talentos. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/923180/analise-de-nitrogenio-total-em-amostras-de-tecido-vegetal-pelos-metodos-de-dumas-e-kjeldahl>>. Acesso em: 25 out. 2018.

EMBRAPA. (2000). **Métodos de Análises de Tecidos Vegetais Utilizados na Embrapa Solos.** Circular Técnica Nº 6 - Manual, Solos, 41.

FAQUIN, V. **Diagnose do estado nutricional das plantas.** 2002. 77 f. Curso de Pós Graduação; "Lato Sensu" à distância. (Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas

no Agronegócio) - Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2002.

FERREIRA, A. K. C.. **AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISES QUÍMICAS DE NUTRIENTES EM TECIDO VEGETAL**. 2014. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós- Graduação em Manejo de Solo e Água, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2014.

FERREIRA, M. D. **DETERMINAÇÃO DE MACRONUTRIENTES NA POLPA IN NATURA DO FRUTO AÇAÍ (EUTERPE OLERACEA MART.), COMERCIALIZADA EM SÃO LUIS, MA**. 2017. 46 f. Monografia - Curso de Química Industrial, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2017.

FOGLIATTO, F.; SILVEIRA, G. **Organização de Textos Científicos**, 2007. Disponível em: <http://www.producao.ufrgs.br/arquivos/disciplinas/146_seminario_de_pesquisa_2_diretrizes_referencial_teorico.doc>. Acesso em: 28 set. 2018.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. **Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta**. Circular Técnica, N°63. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. p9.

GIBSON, R. B.; **The Determination Of Nitrogen By The Kjeldahl Method**. *Journal of the American Chemical Society*. 1904. ed.26 , p. 105 - 110.

GOMES, A.C.C.O; CARVALHO, L.A.C; SÚAREZ, Y.R; NOVAK, E; MOREIRA, R.M. **Análise de parâmetros físicos, químicos e microbiológicos de poços de monitoramento em área aplicada com vinhaça**. Revista Águas Subterrâneas, v. 32, n. 2, p. 237-247, 2018.

KANT, S. 2017. **Understanding nitrate uptake, signaling and remobilization for improving plant nitrogen use efficiency**. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 68(8): 1-8

LI X.G., JIA B; LV J.T.; MA Q.J.; KUZYAKOV Y., LI F.M.. **Nitrogen fertilization decreases the decomposition of soil organic matter and plant residues in planted soils**. *Soil Biol Biochem*. ed.112. p. 47 – 55, 2017.

MCKENZIE, H. A. **The Kjeldahl Determination of Nitrogen: Retrospect and Prospect**. *Trends Anal. Chem*. ed.13, vol.4, p. 138–144, 1994.

MALAVOLTA, E.; Vitti, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. Piracicaba: Potafós, 1997, p. 319.

MAPA. **Determinação de Nitrogênio Total em Leite e derivados Lácteos pelo método de Micro-Kjedahl**. 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/legislacoes-e-metodos/arquivos-metodos-da-area-poa-iqa/met-poa-11-02-proteinas.pdf>>. Acesso em: 05 out. 2018.

MOREIRA, G. L. P; PRATES, C. J. N; OLIVEIRA, L. M; VIANA, A. E. S; JUNIOR, N. S. C; FIGUEIREDO, M. P. **Composição bromatológica de mandioca (Manihot esculenta) em função do intervalo entre podas**. Rev. de Ciências Agrárias, Lisboa, v. 40, n. 1, p. 144-153, mar. 2017. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-018X2017000100017&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 15 fev. 2019.

PERISSÉ, A.R.S. **Revisões sistemáticas e diretrizes clínicas**. Rio de Janeiro: Reichmann e Afonso, 2001.

RODRIGUES, A. N.; SILVA, T. E.; DETMANN, E.. **Concentrações De Hidróxido De Sódio Nas Soluções De Destilação Do Método De Kjeldahl Sobre A Quantificação Do Nitrogênio Total**. Nova Odessa: Bol. Ind. Anim., v. 75, n.1, 2018. 8 p.

SAGGIN, S. F. **AVALIAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE HORTALIÇAS ORGÂNICAS CONGELADAS**. 2017. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Curso de Nutrição, Departamento de Ciências da Vida, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, 2017.

SAMPAIO, R.F., MANCINI, M.C. **Estudos de revisão sistemática: um guia para síntese criteriosa da evidência científica**, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfis/v11n1/12.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2018.

SANTOS, A. B.; MOURA, C. L.; CAMARA, L. B. **Determinação da autenticidade dos méis vendidos nas feiras livres e comércios populares**. Brazilian Educational Technology: research and learning. v.2, n.3. 2011.

SANTOS, C.C.S; GUIMARÃES, P.B; RAMOS, S.A; CAPOBIANGO, M. **Determinação da composição centesimal de farinha obtida a partir da casca de abacaxi**. v.6, n.2,p.341-344, 2017. Disponível em: <<http://periodicos.pucminas.br/index.php/sinapsemultipla>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

SCARLATO, R. C; MIRANDA, N. G. M; COSTA, R. S; SIMÕES, K. M. A; VIDAL, I. K; REGO, E. C. P. **Determinação do teor de proteínas e carboidratos totais em suplementos tipo Whey Protein.** Revista do Instituto Adolfo Lutz. v. 75, p. 01-07, 2016.

SILVA, F.S; SILVA, L.D; MACEDO, E.Q; MENDES, P.B. **Estudo de diferentes condições de preparo de amostra na determinação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.** Revista de Ciências Ambientais. Canoas, v.10, n.2, p.07-20, 2016.

SILVEIRA, D. C; BONETTI, L. P; TRAGNAGO, J. L; NETO, N.; **Determinação de Teores de Nitrogênio Foliar em Azevém (*Lolium multiflorum Lam.*) Nativo na Região do Alto Jacuí, Rio Grande Do Sul.** Rev. Ciência e Tecnologia, Rio Grande do Sul, v.1, n.2, p 18-24, 2015.

SOARES, H. R. NETO, E. B.; BARRETO, L. P.; LIRA, R.M.; LUCENA, E. H. L.; LIMA, N. S. ; SILVA, M. A.. **COMPARAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE N-TOTAL EM TECIDO VEGETAL.** 2013. Disponível em: <<http://www.eventosufrpe.com.br/2013/cd/resumos/R0393-1.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2018.

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. H. **As clorofilas.** Ciencia Rural. vol.35, n.3, pp.748-755, 2005.

VELP, SCIENTIFICA. **Determinação de Nitrogênio/Proteína em Queijos de acordo com o método de Kjeldahl.** Disponível em: <http://www.lobov.com.br/paginas/noticias_pdf/Determinacao_de_Nitrogenio.pdf>. Acesso em: 10 out. 2018.

VIEIRA, A. F. CASTAGNARA, D. D.; DAL ZOTTO, C. S. M; FRAPORTI, L.; MALAGUEZ, E. G.; HOCH, G. C.. **METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGÊNIO.** 2016. Disponível em: <<http://seer.unipampa.edu.br/index.php/siepe/article/view/18314>>. Acesso em: 01 nov. 2018.

YASUHARA, T.; NOKIHARA, K. (2001) **High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method.** J. Agric. Food. Chem. Vol. 49. p. 4581–4583.