

# SEÇÃO: RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

## FRACIONAMENTO DO NITROGÊNIO ORGÂNICO DO SOLO A PARTIR DE HIDRÓLISES SUCESSIVAS<sup>1</sup>

FLÁVIO A. de O. CAMARGO<sup>2</sup>, CLESIO GIANELLO<sup>3</sup>, CAIO VIDOR<sup>3</sup>

**RESUMO** – Este trabalho teve por objetivo avaliar o fracionamento do N-orgânico através da comparação entre dois métodos de hidrólises sucessivas, utilizando-se dez solos representativos do Rio Grande do Sul. Em ambos os métodos, as formas orgânicas do nitrogênio foram extraídas das amostras de solo, pela aplicação de diferentes concentrações de ácido e tempos de hidrólise, obtendo-se desta forma hidrolisados de HCl 1N/3h (H1), HCl 3N/3h (H2), HCl 6N/4h (H3) e HCl 6N/20h (H4). Para a diferenciação entre métodos, conduziu-se uma segunda hidrólise sobre estes hidrolisados utilizando-se ácido propiônico e HCl concentrados (1:1) para a estimativa da fração N- $\alpha$ -amino. O método que sofreu apenas uma hidrólise caracterizou-se por uma pequena recuperação da fração N- $\alpha$ -amino, enquanto o modificado proporcionou maior extração dessa forma de nitrogênio pela inclusão da dupla hidrólise, diminuindo conseqüentemente, a fração N-não identificado. Aplicou-se uma simplificação metodológica aos quatro estágios hidrolíticos descritos, com o objetivo de reduzi-los à metade, obtendo-se assim, apenas os dados de H1 e H2 e estimando-se matematicamente o somatório total. Esta simplificação mostrou-se inadequada por subestimar os valores determinados, observando-se uma melhor estimativa das frações de N-orgânico através de um novo ajuste, seguindo a racionalidade da simplificação proposta. De modo geral, verificou-se através da separação individual dos hidrolisados uma recuperação de 63,2% de uma fração mais lábil presente nos dois primeiros estágios da hidrólise sucessiva (H1 e H2), sendo o remanescente (H3 e H4) oriundo de uma fração mais recalcitrante.

*Palavras-chave:* solo, nitrogênio orgânico, hidrólise sucessiva.

## FRACTIONATION OF SOIL ORGANIC NITROGEN BY MEANS OF SUCCESSIVE HYDROLYSIS

**ABSTRACT** – This study was conducted with the objective of identifying the main forms by which the organic N occur in ten soils of Rio Grande do Sul-Brazil as determined by two methods of successive hydrolysis. Among the methods the fractions was extracted from soils by applying different acid concentration and hydrolysis periods, to obtain hydrolyzed of 1N HCl/3h (H1), 3N HCl/3h (H2), 6N HCl/4h (H3) and 6N HCl/20h (H4). For methods differentiation, a second hydrolysis was performed in these hydrolyzed with propionic and perchloric concentrated acids for the estimation of the  $\alpha$ -amino-N fraction. The method with only one hydrolysis was inefficient for characterizing the  $\alpha$ -amino-N fraction, whereas the method modification proposes by the same authors enhances the extraction of thus fraction with a consequent decrease of the nonidentified-N fraction. A methodological simplification was applied in the four described hydrolyzate stages with the objective of reducing then to half, obtaining, in this way, only H1 and H2 data, and estimating by equations the total of four stages. This simplification underestimated the values of the N-organic fractions. As a result new equations were adjusted, showing a better estimation of the different fractions. About 63% of the hydrolyzed-N was recovered during the first two stages of the successive hydrolysis (H1 and H2), the remaining being a more recalcitrant fraction present in the last two stages (H3 and H4).

*Key words:* soil, organic nitrogen, successive hydrolysis.

1. Trabalho apresentado na XXI Reunião Brasileira de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas, Petrolina, 28 de agosto a 02 de setembro de 1994.

2. Aluno de Doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia UFRGS, Caixa Postal 776, 90001-970 Porto Alegre, RS.

3. Eng<sup>o</sup> Agr<sup>o</sup>, Ph. D.-Prof. do Departamento de Solos, Faculdade de Agronomia UFRGS.

Recebido para publicação em 20/07/1995.

## INTRODUÇÃO

Os métodos usualmente utilizados para a análise do N-orgânico no solo baseiam-se no aquecimento contínuo da amostra na presença de HCl 6N sob refluxo em períodos que variam de 6 a 24 horas, característica das técnicas degradativas de análise de proteínas (STEVENSON, 1982). Estes métodos são rápidos e a extração protéica é completa, mas falham em analisar a grande proporção do N-não identificado, produzido em parte pela decomposição de compostos orgânicos nitrogenados ou por interações secundárias produzidas durante a hidrólise (JANEL et al., 1979).

As formas desconhecidas do nitrogênio, segundo SOWDEN et al. (1977), podem ser estimadas pelas porcentagens do N-não identificado hidrolisável, do N-não hidrolisável mais a metade da concentração de N-amônio (correção para o conteúdo de N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> fixado por argilas e NH<sub>4</sub><sup>+</sup> formado pela hidrólise de amidas e hidróxi-aminoácidos). Partindo dessas premissas, esses autores fracionaram o N-total de 104 amostras de solo das mais distintas condições climáticas e constataram que a forma não identificada do nitrogênio foi cerca de 41 a 46% do N-total. Baseados nestes valores, IVARSON e SCHNITZER (1979) isolaram esta fração desconhecida com o objetivo de verificar seu comportamento frente à microbiota do solo a pH 7,0. Os autores constataram que a maior parte desta fração é biodegradável, portanto, passível de influir no balanço do nitrogênio, principalmente em termos de disponibilidade às plantas.

Para melhorar a estimativa e reduzir a fração não identificada do N-orgânico foram propostos métodos com utilização de hidrólises sucessivas. Estes caracterizam-se por submeter a amostra a várias hidrólises a diferentes tempos e concentrações de ácido (GONZALEZ-PRIETO et al., 1984; GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1988 e 1992; JANEL et al., 1979; SCHNITZER e HINDLE, 1981). O método proposto por GONZALEZ-PRIETO et al. (1984) envolve quatro hidrólises a tempos e concentrações diferentes sobre a mesma amostra. Esses autores observaram que o método era limitado em estimar a fração N- $\alpha$ -amino, o que os levaram a introduzir uma segunda hidrólise sobre o hidrolisado original (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1988). Foi observa-

do ainda que a soma das frações contidas nas duas primeiras hidrólises apresentava correlação significativa com o somatório das mesmas frações dos quatro hidrolisados. Assim, foi proposta uma simplificação do método de fracionamento (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1992). Com a simplificação, determinam-se apenas as frações contidas nos dois primeiros hidrolisados, sendo a quantidade total de cada fração na amostra estimada por ajustamento matemático proposto pelos autores. Apesar de laboriosos, esses métodos demonstram que a hidrólise fracionada do N-orgânico libera cerca de 40% da fração lábil pelo tratamento com HCl 3 N por 3 horas e cerca de 60% de uma fração não lábil, que requer o tratamento com HCl 6N durante 20 horas.

O melhor conhecimento da suscetibilidade das formas de N-orgânico à mineralização proporcionaria maior precisão nas recomendações de adubação nitrogenada às plantas. A partir destas considerações, desenvolveu-se a presente pesquisa com o objetivo de comparar o método de hidrólises sucessivas, proposto por GONZALEZ-PRIETO et al. (1984), com o modificado descrito por GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1988), para avaliar o fracionamento do N-orgânico presentes em solos subtropicais. Objetivou-se também testar a simplificação do método modificado proposto por GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1992), como forma de reduzir os procedimentos recomendados pelo método modificado.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de solo utilizadas foram coletadas do horizonte superficial (0 - 20 cm) de 10 solos representativos do Rio Grande do Sul, compreendendo uma ampla faixa de teores de matéria orgânica (17 a 56 g/kg), nitrogênio (0,9 a 2,5 g/kg), pH (4,0 a 6,4) e conteúdo de argila (180 a 550 g.dm<sup>-3</sup>). Duas amostras, por solo, contendo cerca de 10 mg de N-orgânico/amostra foram submetidas às hidrólises descritas pelo método de GONZALEZ-PRIETO et al. (1984) e à modificação proposta pelos mesmos autores para a dupla hidrólise dos aminoácidos contendo grupamentos  $\alpha$  (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1988). Em ambos os métodos, o N-orgânico foi fracionado a partir de quatro hidrólises sucessivas da mesma amostra com HCl 1 N por 3 horas, HCl 3 N por 3 horas, HCl

6 N por 4 horas e HCl 6 N por 20 horas, referidas como H1, H2, H3 e H4, respectivamente. A modificação consistiu de uma segunda hidrólise sobre o primeiro hidrolisado, utilizando HCl e ácido propiônico concentrados (1:1) em bombas de reação a 150 °C por 15 minutos. Após a neutralização de cada hidrolisado, foi determinado o N-hidrolisado total (micro Kjeldahl); o N-amônio e N-amida pela destilação com MgO; o N-hexosamina pela destilação com o tampão fosfato-borato, subtraindo-se o valor de N-amônio; o N- $\alpha$ -amino foi determinado por destilação do hidrolisado após reação com ninhidrina (pH 2,5 a 100 °C) e pré-tratamento da amostra com NaOH 0,5 N e tampão fosfato-borato. A diferença entre a soma destes valores e do N-hidrolisado total, resultou no valor do N-não identificado. No método simplificado (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1992) foram obtidas equações lineares a partir da correlação entre o  $\Sigma Ht$  (H1 + H2 + H3 + H4) e o  $\Sigma H$ (H1 + H2), ou seja, com os dados de H1 + H2 estima-se o  $\Sigma Ht$  das equações para as diferentes frações: N-amônio  $Y = 2,395 + 1,361X$   $r = 0,878$ ; N-hexosamina  $Y = 0,309 + 1,339X$   $r = 0,985$ ; N- $\alpha$ -amino  $Y = -0,051 + 1,222X$   $r = 0,983$ ; N-não identificado  $Y = 4,393 + 1,047X$   $r = 0,943$  e N-hidrolisado  $Y = 6,439 + 1,155 X$   $r = 0,966$ , onde  $Y = \Sigma Ht$  e  $X = \Sigma H$  são expressos pela porcentagem de N-orgânico. A partir dos procedimentos normais da análise de variância, compararam-se as médias pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A principal diferença entre o método original e o modificado foi constatada na fração N- $\alpha$ -amino (Tabela 1). Esta fração é afetada pelos ciclos de aquecimento e resfriamento característicos da hidrólise sucessiva, sendo ge-

ralmente subestimada. A origem deste decréscimo está na formação de complexos nitrogenados a partir da degradação de aminoácidos (SCHNITZER e HINDLE, 1981). Além do erro introduzido pelo fator físico (alteração da temperatura) na metodologia, existe ainda o efeito de natureza química. Com o aumento do tempo e da concentração de HCl, pode ocorrer a degradação de aminoácidos, como no caso da asparagina constatada por YONEBAYASHI e HATTORI (1980). Essas constatações já haviam sido observadas por GONZALEZ-PRIETO et al. (1984), que resultaram na modificação do método original (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1988) para determinação do N- $\alpha$ -amino hidrolisado, incluindo a dupla hidrólise com ácido propiônico. Aparentemente, o ácido propiônico aproximaria o HCl das ligações menos acessíveis (SCOTCHLER et al., 1970). Conforme verificado por esses autores, a dupla hidrólise proporcionou maior extração do N- $\alpha$ -amino que o método original (cerca de 122%). No presente trabalho, o aumento da fração N- $\alpha$ -amino foi de aproximadamente 50%. A utilização do ácido propiônico mostrou que cerca de 27% da fração desconhecida hidrolisada era proveniente da degradação de aminoácidos. O aumento na fração N- $\alpha$ -amino pode ainda ser considerado como sendo resultante da desaminação de produtos insolúveis provenientes de compostos nitrogenados, polissacarídeos e polifenóis liberados durante os estágios da hidrólise (JANEL et al., 1979).

Os dados constantes na Tabela 1 mostram que o método simplificado subestimou os valores obtidos. Estatisticamente, as diferenças foram mais acentuadas na fração hidrolisada total, N- $\alpha$ -amino e N-não identificado. Neste trabalho, a utilização de H1 e H2, a partir do ajuste matemático proposto por GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1992), foi insuficiente para

**TABELA 1 – Distribuição das formas orgânicas de nitrogênio em solos do Rio Grande do Sul (médias de dez solos) determinadas através de hidrólises sucessivas proposto por GONZALEZ-PRIETO et al. (1984) e GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1988 e 1992)**

Métodos /frações	N-Hidro.	N-Amônio	N-Amida	N-Hexosa.	N- $\alpha$ -amino	N-fident.
	% N-total					
Original (1984)	53,1 a	4,1 b	3,1 a	11,0 a	12,1 c	22,8 a
Modificado (1988)	53,1 a	4,1 b	3,1 a	11,0 a	18,1 a	16,8 b
Simplificado (1992)	52,0 b	7,3 a	0,0 b	9,9 a	17,4 b	13,6 b
Ajustado	53,1 a	7,2 a	0,0 b	11,0 a	18,1 a	16,8 b
CV%	3,34	0,56	0,87	8,58	0,57	12,11
DMS (5%)	1,02	0,04	0,58	1,12	0,09	1,53

estimar os valores das frações do N-orgânico do solo. Em vista disso, houve a necessidade de um novo ajustamento matemático com base nas quatro hidrólises do presente trabalho. As equações obtidas são a seguir apresentadas: N-amônio  $Y=17,93 + 1,252X$   $r=0,97$ ; N-hexosamina  $Y=50,94 + 1,1141X$   $r=0,80$ ; N- $\alpha$ -amino  $Y=15,42 + 1,445X$   $r=0,91$ ; N-não indentificado  $Y=-27,98 + 1,647X$   $r=0,87$ ; e N-hidrolisado  $Y=-135,39 + 1,861X$   $r=0,97$ , onde  $Y$  = estima  $\Sigma Ht$  ( $\text{mgN.kg}^{-1}$  solo), e  $X$  =  $\Sigma H$  ( $\text{mgN.kg}^{-1}$  solo). O novo ajuste estimou adequadamente as frações, utilizando-se as novas equações propostas conforme mostra a Tabela 1. A subestimação constatada no modelo original de GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1992) foi devido provavelmente ao fato de que os solos utilizados por esses autores não são abrangentes como os mesmos preconizam, apresentando conteúdos elevados de carbono e nitrogênio, quando comparados com os solos do presente trabalho. Desta forma, qualquer estimativa desta natureza seria mais adequada se estivesse associada à obtenção de ajustes específicos para determinada região.

Não houve diferenças entre as frações  $\text{NH}_4^+$  total e  $\text{NH}_4^+$  + N-amida, embora, a estimativa adicional da forma N-amida representa uma vantagem do método (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1988; YONEBAYASHI e HATTORI, 1980). Considerando-se a soma das frações N-amônio (7,3%), N-hexosamina (9,9%) e N- $\alpha$ -amino (17,4%), obter-se-ia um valor de 18,5% para N-não indentificado por diferença com o N-hidrolisado. Entretanto, o valor estabelecido pela simplificação foi de 13,6%, representando uma diminuição de cerca de 26% da fração N-não indentificado. Essa foi a fração mais afetada pelo ajuste proposto por GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1992).

Cerca de 63,2% do N-total foi hidrolisado nos dois primeiros estágios (Figura 1a).

GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1991) verificaram que o somatório dos dois primeiros estágios é responsável pela estimativa de mais de 65% do N-orgânico existente em amostras provenientes de 23 locais do nordeste da Espanha. Esta constatação resultou na proposta da simplificação do método com a utilização do  $\Sigma H$  para estimar as diferentes frações do N-orgânico que seriam obtidas pelo tratamento das amostras com quatro hidrólises sucessivas ( $\Sigma Ht$ ).

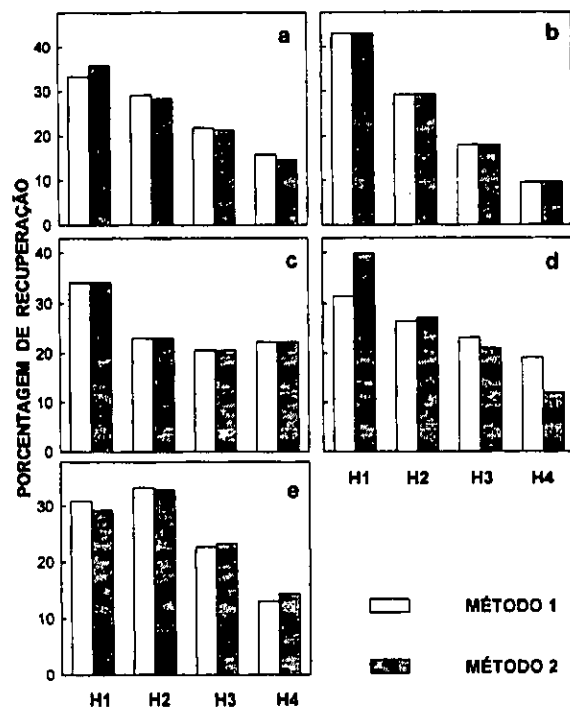


FIGURA 1 – Porcentagem de N-hidrolisado total (a), N-amida (b-H1), N-amônio (b-H2, H3 e H4), N-hexosamina (c), N- $\alpha$ -amino (d) e N-não indentificado (e), recuperado em H1 (HCl 1N/3h), H2 (HCl 3N/3 h), H3 (HCl 6N/4h) e H4 (HCl 6N/20h), determinado através de hidrólises sucessivas pelo método original (1) e modificado (2), descritos por GONZALEZ-PRIETO et al. (1984) e GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1988), respectivamente

Observa-se ainda que em H1 (HCl 1N/3h) houve uma recuperação média de 35% das formas hidrolisadas nos dois métodos (Figura 1a). Das formas presentes em H1, a fração N-amida foi a que ocorreu em maior proporção, com cerca de 43,1% (Figura 1b). A princípio, esta situação é o concordante com o fato da hidrólise fracionada do N-orgânico proporcionar cerca de 40% de uma fração lábil hidrolisada nos dois primeiros estágios (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1988). O N-amônio presente nos hidrolisados H2, H3 e H4 é derivado da decomposição de compostos orgânicos e do amônio fixado nas argilas, não sendo determinado em H1 porque nesta hidrólise são estimados apenas o amônio inorgânico e o N-amida, representada na Figura 1b como H1 (YONEBAYASHI e HATTORI, 1980). De forma concordante com GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1988), metade do N-amônio foi produzido durante a

hidrólise com HCl 3N durante três horas (Figura 1b).

No presente trabalho, a recuperação da fração N-hexosamina em H1, H2, H3 e H4 foi de 34,1%, 23%, 20,6% e 22,3%, respectivamente, constatando-se uma distribuição equitativa, principalmente nos três últimos estágios (Figura 1c). Estes dados contrariam os resultados obtidos por GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1988), que observaram duas subfrações distintas de N-hexosamina em termos de resistência à hidrólise. A fração mais lábil hidrolisada por HCl 1N (H1) recuperou cerca de 54% do total obtido, enquanto que na fração mais recalcitrante obteve-se cerca de 37% com a hidrólise HCl 6N (H3), ficando os 9% restantes distribuídos em H2 e H4.

Na hidrólise da fração N- $\alpha$ -amino, observa-se que os teores presentes nas frações H1 e H2 foram cerca de 10% superiores ao método original (GONZALEZ-PRIETO et al., 1984, Figura 1d). Estes resultados são concordantes com JANEL et al. (1979), SCHNITZER e HINDLE (1981) e GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1988), uma vez que a maioria dos aminoácidos livres, ou em cadeias peptídicas, não necessitam de ácidos muito concentrados para hidrólise total. Os resultados também são concordantes com os de YONEBAYASHI e HATTORI (1980) e SCHNITZER e HINDLE (1981) que constataram a necessidade de utilizar HCl 6N durante 24 horas para hidrólise total das proteínas. Na Figura 1d, observa-se que a soma dos percentuais obtidos em H3 e H4 totaliza 37%.

Em termos de N-total, a recuperação da fração N- $\alpha$ -amino pelo método modificado em relação ao método original foi 1,89 vezes maior em H1, 1,53 vezes maior em H2 e 1,36 vezes maior em H3. Apenas em H4 a recuperação foi menor do que a obtida pelo método original (0,96) provavelmente em função da desaminação parcial. Por isso, GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS (1988) não recomendam a utilização da dupla hidrólise com ácido propiônico e clorídrico no último estágio (H4).

Não houve diferença significativa entre os métodos na determinação do N-não identificado presente em H1 e H2 (Figura 1e). Em torno de 63% desta fração foi recuperada nos dois primeiros estágios, sendo o remanescente (37%) oriundo de uma fração mais recalcitrante presente nos hidrolisados H3 e H4. Estes valores sugerem que o aumento do N-não identificado

no hidrolisado, especialmente nos estágios iniciais possa ser devido à menor recuperação inicial do N- $\alpha$ -amino.

A recuperação de 63,2% de formas hidrolisadas no Nitrogênio orgânico constatada nas hidrólises com HCl 1 e 3 N por 3 horas. (H1 e H2), identifica uma fração que pode ser utilizada de forma a estabelecer um comportamento de labilidade do N-orgânico do solo. Pode-se também inferir a existência de uma fração recalcitrante não hidrolisada por estes dois estágios, com o aumento do tempo e concentração de ácido (H3-HCl 6N/4h e H4-HCl 6N/20h). O entendimento deste comportamento é essencial no conhecimento da dinâmica do nitrogênio no solo, principalmente em termos de suscetibilidade destas frações à mineralização proporcionada pela ação microbiana. Pelo exposto, o conjunto de hidrólises diferenciadas em termos de tempo e concentração de ácido, descritos pela metodologia das hidrólises sucessivas, permite inferir sobre o potencial de mineralização do N-orgânico, principalmente sobre as formas lábeis prontamente disponíveis às plantas.

## CONCLUSÕES

– O método descrito por GONZALEZ-PRIETO et al. (1984) caracterizou-se por uma pequena recuperação da fração N- $\alpha$ -amino, enquanto o modificado (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1988) proporcionou maior extração dessa forma de Nitrogênio, diminuindo a fração N-não identificado.

– A simplificação do método modificado (GONZALEZ-PRIETO e CARBALLAS, 1992) mostrou-se inadequada por subestimar os valores determinados, obtendo-se uma melhor estimativa das frações de N-orgânico através de um novo ajuste para os solos em estudo, seguindo a racionalidade da proposta de simplificação.

Através da separação individual dos hidrolisados, constatou-se uma recuperação de 63,2% de uma fração mais lábil presente nos dois primeiros estágios da hidrólise sucessiva (H1 e H2), sendo o remanescente oriundo de uma fração mais recalcitrante presente nos hidrolisados H3 e H4.

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- GONZALEZ-PRIETO, S.J.; CARBALLAS, T. Composition of organic N in temperate humid region soils (NW Spain). *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.23, n.7, p.887-895, 1991.

- GONZALEZ-PRIETO, S.J.; CARBALLAS, T. Modified method for the fractionation of soil organic nitrogen by successive hydrolysis. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.20, n.1, p.1-6, 1988.
- GONZALEZ-PRIETO, S. J.; CARBALLAS, T. Simple step-wise acid hidrolisis method for the fractionation of soil organic nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, n.9, p.925-926, 1992.
- GONZALEZ-PRIETO, S. CARBALLAS, M., CARBALLAS, T. First results on the effect of number on stages of the hydrolytic analysis of the distribution of nitrogenated organic compounds in cale slurry. *Anales de Edafologia y Agrobiologia*, Madrid, v.43, n.7, p.1243-1246, 1984.
- IVARSON, K. C.; SCHNITZER, M. The biodegradability of the "unknown" soil-nitrogen. *Canadian Journal of Soil Science*, Ottawa, v.56, n.1, p.59-67, 1979.
- JANEL, P.; JOCTEUR MONROZIER, L.; TOUTAIN, F. Caracterization de l'azote des litiens et des sols par hydrolyse acid. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.11, n.2, p.141-146, 1979.
- SCHNITZER, M.; HINDLE, D.A. Effects of different methods of acid hydrolysis on the nitrogen distribution in two soils. *Plant and Soil*, The Hague, v.60, n.2, p.237-243, 1981.
- SCOTCHLER, J.; LOZIER, R.; ROBINSON, A.B. Cleavage of single amino acid residues from Merrifield resin with hydrogen chloride and hidrogen fluoride. *Journal of Organic Chemistry*, New York, v.35 n.16, p.3151-3152, 1970.
- SOWDEN, F.J.; CHEN, Y.; SCHINITZER, M. The nitrogen distribution in soils formed under widely differing climatic conditions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, London, v.41, n.8, p.1524-1526, 1977.
- STEVENSON, F.J. Organic forms of soil nitrogen. In: STEVENSON, F.J. *Nitrogen in agricultural soils*. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.67-122.
- YONEBAYASHI, H.; HATTORI, T. Improvenents in the method for fractional determination of soil organic nitrogen. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokio, v.26, n.3, p.469-481, 1980.