

TEMPO DE HIDRÓLISE E CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO PARA FRACTIONAMENTO DO NITROGÊNIO ORGÂNICO DO SOLO¹

FLÁVIO A. DE OLIVEIRA CAMARGO, CLESIO GIANELLO e CAIO VIDOR²

RESUMO - Foram estudados tempos de hidrólise (3, 6, 12, 20, 24 e 36 h) e concentrações de ácido (HCl 1N, 3N e 6N) na recuperação de formas orgânicas de N provenientes de substâncias nitrogenadas conhecidas ou presentes no solo pelos métodos de "hidrólise contínua" e "hidrólise seqüencial". Os polímeros de maior peso molecular, como a quitina, necessitaram mais de 36 horas para a hidrólise completa. Houve maior decomposição da glicosamina à medida que aumentou o tempo de hidrólise, resultando em aumento da fração amida. Houve pequena decomposição da glicosamina a N-amônio na hidrólise com HCl 1N/3 h, embora tenha havido hidrólise parcial da quitina a glicosamina. A recuperação de N-amida foi completa nas hidrólises com HCl 1N/3 h, HCl 3N/3 h, HCl 6N/4 h e HCl 6N/20 h. A hidrólise contínua não foi eficiente para degradar os polímeros nitrogenados de maior peso molecular, além de decompor açúcares aminados. Neste trabalho, observou-se a necessidade da utilização de mais de uma hidrólise com tempo e concentrações diferentes para a caracterização adequada de formas orgânicas nitrogenadas presentes no solo.

Termos para indexação: N-hidrolisado, N-não hidrolisado, N-amônio, N-amida, N-hexosamina, N- α -amino, N-não-identificado, podzólico vermelho-amarelo.

TIME OF HYDROLYSIS AND ACID CONCENTRATION FOR FRACTIONATION OF ORGANIC NITROGEN

ABSTRACT - Time of hydrolysis (3, 6, 12, 20, 24, and 36 h) and acid concentration (HCl 1N, 3N, and 6N) were evaluated for recovering of N from known organic compounds and from soil by means of continuous and step-wise hydrolytic methods. High molecular weight polymers, like chitin, required more than 36 h for complete hydrolysis. Higher glucosamine decomposition was attained as time of hydrolysis increased, resulting in increasing amounts of amide fraction. There was a little decomposition of glucosamine to ammonium when hydrolysis was carried out with HCl 1N for 3 h, though chitin was partially hydrolyzed to glucosamine. N-amide was completely recovered using HCl 1N/3 h, HCl 3N/3 h, HCl 6N/4 h, as well as HCl 6N/20 h. Twelve hour hydrolysis was not enough to completely degrade high molecular weight polymers in continuous hydrolysis, though there was a degradation of amino sugars. The data emphasize the requirement of using more than one hydrolysis with different times and acid concentrations to better characterize the organic nitrogen fractions occurring in the soil.

Index terms: hydrolysable-N, non hydrolysable-N, ammonium-N, amide-N, hexosamine-N, α -amino-N, unidentified-N, Red-Yellow Podzol.

INTRODUÇÃO

O N ocupa posição de destaque entre os elementos essenciais ao desenvolvimento das plantas. É requerido em quantidades consideráveis para o pleno desenvolvimento delas. Apesar de apresentar-se na

camada arável do solo, em alguns casos em quantidades relativamente elevadas (mais de 7.000 kg.ha⁻¹), sua baixa disponibilidade no solo, somada à grande necessidade das plantas, faz com que seja um dos nutrientes mais limitantes à produtividade da maioria das culturas (Stevenson, 1982). A baixa disponibilidade deve-se ao fato de que 95%, ou mais, do N encontra-se complexado na forma orgânica, sendo uma pequena parte mineralizada pela microbiota do solo durante o ciclo de determinada cultura (Bremner, 1965; Stevenson, 1982).

¹ Aceito para publicação em 5 de julho de 1996.

² Eng. Agr., Ph.D., Prof. Adj., Dep. de Solos da Fac. de Agron., Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Caixa Postal 776, CEP 91540-000 Porto Alegre, RS.

O conhecimento destas formas orgânicas do N é baseado em estudos envolvendo a identificação e estimativa dos compostos nitrogenados liberados por hidrólise ácida (Bremner, 1965). Em geral, verificam-se muitas variações nas condições hidrolíticas, destacando-se: a) tipo e concentração de ácido, b) tempo e temperatura, c) quantidade de amostra, e d) pré-tratamento da amostra (Schnitzer & Hindle, 1981; Stevenson, 1982). O procedimento mais usado é a hidrólise contínua com HCl 6N sob refluxo, com tempo variando entre três e vinte e quatro horas, com base na técnica degradativa derivada da análise de proteínas (Stevenson, 1982). Este procedimento é rápido e a extração protéica é completa, mas falha em analisar no solo a grande parte do N-não-identificado (Gonzalez-Prieto & Carballas, 1988), produzido, em parte, pelas interações secundárias ("artifacts") entre compostos nitrogenados, polissacarídeos e polifenóis liberados na hidrólise prolongada, resultando em desaminação e formação de produtos insolúveis (Janel et al., 1979).

Dos inúmeros métodos desenvolvidos para determinar as formas do N-orgânico do solo, o mais utilizado é o descrito por Bremner (1965), e envolve a hidrólise por doze horas com HCl 6N fervente sob refluxo, analisando N-amônio por destilação após adição de MgO, N-hexosamina após adição de tampão fosfato-borato a pH 11,2, e N-aminoácidos após reação com ninhidrina a pH 2,5. Ressalta-se, também, que na sua maioria, os métodos baseados na hidrólise contínua não consideram a degradação de hexosaminas durante o processo de hidrólise (Yonebayashi & Hattori, 1980), sendo que alguns utilizam fatores de correção para ajustamento dos valores obtidos (Bremner, 1965).

Os métodos que utilizam a hidrólise seqüencial, propostos para diminuir as limitações da hidrólise contínua, são caracterizados por submeter a amostra a várias hidrólises (Janel et al., 1979; Schnitzer & Hindle, 1981; Gonzalez-Prieto & Carballas, 1988, 1992) ou por hidrolisá-la a tempos e concentração de ácido diferentes (Yonebayashi & Hattori, 1980). Entretanto, os dados apresentados por Schnitzer & Hindle (1981) demonstram que a hidrólise seqüencial não teve nenhuma vantagem sobre a hidrólise contínua. Esta hidrólise aumenta a formação de complexos nitrogenados desconhecidos re-

sultantes de interações secundárias produzidas pelo repetido aquecimento e resfriamento da amostra. Este aumento ocorre às custas do N presente na forma de aminoácidos, promovendo, desta forma, estimativas errôneas no fracionamento do N-orgânico do solo.

Considerando essas limitações e a necessidade de conhecer como se comportam as frações de N-orgânico, desenvolveu-se esta pesquisa, com o objetivo de avaliar condições hidrolíticas (tempo e concentração de HCl) mais adequadas para estimar o N presente em compostos nitrogenados, pela extração com métodos hidrolíticos contínuos e seqüenciais.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo, conduzido no Laboratório de Análise de Solos do Departamento de Solos da Faculdade de Agronomia da UFRGS, utilizaram-se amostras puras de NH_4Cl , acetamida, D-glicosamina, D-treonina, D-asparagina, D-alanina, D-serina e compostos de maior peso molecular, como quitina e caseína (Sigma Chemical Co.), com o objetivo de verificar a porcentagem de recuperação destes compostos como N-NH_4^+ e a eficiência dos métodos hidrolíticos. Desses compostos, pesou-se uma amostra contendo 10 mg de N (três repetições), que foram submetidas aos seguintes tratamentos: a) hidrólise a 110°C sob refluxo com 20 ml de HCl 6N, durante doze horas, de acordo com o método de Bremner (1965) e Stevenson (1982); b) hidrólise a 110°C sob refluxo com 20 ml de HCl 6N durante 24 horas (Yonebayashi & Hattori, 1980); c) hidrólise a 110°C, sob refluxo com 20 ml de HCl 1N durante três horas, de acordo com o método de Yonebayashi & Hattori (1980); e d) quatro hidrólises na mesma amostra a 110°C sob refluxo, sendo H1: HCl 1N por três horas, H2: HCl 3N por três horas, H3: HCl 6N por quatro horas, e H4: HCl 6N por 20 horas, conforme o método descrito por Gonzalez-Prieto & Carballas (1988). Além destes tempos, os compostos descritos acima foram testados quanto ao efeito de 3, 6, 12, 24 e 36 horas de hidrólise com HCl 1N e 6N.

A análise do hidrolisado foi realizada de acordo com Yonebayashi & Hattori (1980), em que a fração N-hidrolisado é representada pelo N-total (micro-kjeldahl), contido no hidrolisado neutro, pelo N-amônio por destilação a vapor com MgO, e pelo N-(amônio + hexosamina) por destilação a vapor com tampão fosfato-borato (pH 11,2), sendo o N-hexosamina calculado por subtração da fração N-(amônio+hexosamina). A fração

N-aminoácido (N- α -amino) foi determinada por destilação a vapor com tampão fosfato-borato (pH 11,2), após tratamento com NaOH (100°C), para decompor hexosaminas e remover N-amônio. Para a conversão de N- α -amino a N-amônio, foi adicionada ninhidrina a pH 2,5 e a 100°C. Na comparação entre hidrólises no solo, utilizou-se um solo Podzólico Vermelho-Amarelo da unidade de mapeamento Passo Fundo (contendo 23 e 0,90 g/kg de matéria orgânica e N total, respectivamente, pH 4,0 e 18% de argila, segundo o método de Tedesco et al., 1985), analisando-se este pelos métodos hidrolíticos descritos por Bremner (1965), Yonebayashi & Hattori (1980) e Gonzalez-Prieto & Carballas (1988).

Os resultados referentes aos compostos-padrões foram expressos como percentagem de recuperação das formas como N-NH₄⁺ sobre o conteúdo total de N presente no composto analisado. O efeito dos tratamentos no solo foram verificados a partir da comparação das médias pelo teste Tukey, após os procedimentos normais de análise de variância, utilizando o programa científico SAS (SAS Institute, 1990).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a avaliação do método, foram utilizados alguns compostos nitrogenados padrões, determinando-se a porcentagem de sua recuperação como N-NH₄⁺, pelo método clássico de hidrólise contínua descrito por Bremner (1965), no qual a amostra é tratada com HCl 6N a 110°C durante doze horas sob refluxo (Tabela 1). Após esta hidrólise, os compostos acetamida e NH₄Cl foram totalmente recuperados (100%) na forma de N-NH₄⁺, enquanto a recuperação da asparagina foi de apenas 48,5%. Nas hidrólises de treonina, serina e alanina não se detectou N-amônio, obtendo-se 10,1% desta forma na caseína. Confirmando a constatação de Bremner (1965), observaram-se altas recuperações de treonina e serina como N- α -amino, indicando a não-decomposição destes aminoácidos com o procedimento utilizado. A recuperação de glicosamina foi de 62,4% na forma de N-hexosamina, indicando que o procedimento sugerido por Bremner (1965) propiciou a degradação desta forma de N a N-NH₄⁺ (32,2%), e, eventualmente, a formação de outros compostos (4%). O fator de correção de 1,25 proposto por Bremner (1965) não foi suficiente para compensar a degradação das formas hexosaminas a amônio após doze horas de hidrólise.

TABELA 1. Percentagem de recuperação de formas orgânicas do N orgânico como N-amônio após hidrólise de compostos nitrogenados padrões, utilizando HCl 6N a 110°C durante doze horas sob refluxo¹.

Composto nitrogenado	N-NH ₄	%	
		N-hexosamina	N- α -amino
Glicosamina	33,2	62,4	0,4
Treonina	0,1	0,2	100,0
Asparagina	48,5	0,2	49,9
Acetamida	100,0	0,0	0,8
Serina	0,0	0,1	99,7
Caseína	10,1	0,0	63,0
NH ₄ Cl	100,0	0,0	0,0
Quitina	27,1	43,6	0,1
Alanina ²	0,0	0,1	7,2

¹ Conforme Bremner (1965).

² Aminoácido não contendo grupamento alfa.

Os resultados confirmam as limitações do procedimento proposto por Bremner (1965) para a hidrólise do N-orgânico. Nesse método o período de hidrólise (doze horas) é insuficiente para a degradação de compostos mais complexos do N-orgânico, e muito longo para outros, como hexosaminas, ocasionando a degradação parcial destas a N-amônio.

Em nosso estudo, a alteração do tempo de hidrólise para 24 e 36 horas aumentou a recuperação da quitina, passando de 72% a 75% (Tabela 2). É também possível que parte (25%) da quitina tenha sido transformada em outros compostos, pois não houve diferença nos valores recuperados entre 24 e 36 horas, sendo que 61% foram recuperados nas primeiras três horas de hidrólise. Observa-se, também, que houve a degradação à forma amoniacal com o aumento no período de hidrólise.

A glicosamina, de forma semelhante à quitina, foi decomposta à medida que aumentou o tempo de hidrólise, resultando em acréscimo proporcional da forma amoniacal. A recuperação da caseína na forma de N- α -amino foi crescente até doze horas, verificando-se uma constância nos valores após este período.

Os resultados obtidos com a alteração da concentração do ácido clorídrico de 6N para 1N são

TABELA 2. Percentagem de recuperação de frações orgânicas do N como N-amônio em função de variações no tempo de hidrólise de compostos nitrogenados utilizando HCl 6N sob refluxo.

Composto	Fração	Tempo (horas)				
		3	6	12	24	36
		----- %				
Glicosamina	N-amônio	6,0	12,1	33,2	47,0	52,5
	N-hexosamina	84,1	78,8	62,4	50,2	45,5
Caseína	N-amônio	10,4	10,3	10,1	9,8	9,5
	N- α -amino	50,1	55,7	63,0	64,2	64,0
Quitina	N-amônio	11,5	19,2	27,1	43,8	59,0
	N-hexosamina	49,8	46,6	43,6	28,3	15,9

mostrados na Tabela 3, para tempos de hidrólise de 3 a 36 horas. Não houve efeito do tempo na degradação de glicosamina a N-amônio (N-NH₄⁺). Tal como observado por Yonebayashi & Hattori (1980), os valores de N-NH₄⁺ e N-hexosamina estabilizaram-se em torno de 10 e 80%, respectivamente, com uma recuperação total menor (90,1%) do que a obtida (95,6%) com o procedimento sugerido por Bremner (1965). Há indícios, no entanto, de que tanto com HCl 1N quanto com HCl 6N haja a transformação de N-hexosamina para outras formas ("artifacts") não identificadas pelo método empregado. No caso da quitina, necessitou-se mais tempo de hidrólise para maior recuperação da fração N-hexosamina e N-amônio. Com 36 horas de hidrólise com HCl 6N, obteve-se quase três vezes menos N-hexosamina (15,9%) do que com três horas (49,8%), o que mostra o efeito tempo na degradação desta à forma N-amônio (Tabela 2). Comparada à glicosamina, a quitina é mais resistente à degradação quando se alteram as condições hidrolíticas (Bremner & Shaw, 1954). A comparação entre as concentrações de HCl 1N (Tabela 3) e 6N (Tabela 2) mostra que a decomposição aumenta quando o ácido é mais concentrado. Na menor concentração, a quitina é fracamente hidrolisada para N-amônio, sendo ainda menor a recuperação da for-

ma N-hexosamina após 36 horas de hidrólise com HCl 1N. A principal vantagem do procedimento sugerido por Yonebayashi & Hattori (1980) consiste na maior recuperação de N-hexosamina, e, conseqüentemente, na melhor estimativa desta forma no solo.

Gonzalez-Prieto et al. (1984) modificaram as condições hidrolíticas utilizadas até então no método clássico para o fracionamento do N-orgânico (Bremner, 1965), submetendo a mesma amostra a quatro hidrólises sucessivas, sendo a primeira (H1) idêntica à segunda (HCl 1N/3 h) descrita por Yonebayashi & Hattori (1980). Observando-se as recuperações da forma N-amida presente na asparagina e acetamida no hidrolisado H1 como N-amônio (Tabela 4), verifica-se que o tratamento da amostra com HCl 1N por 3 horas (H1) hidrolisou satisfatoriamente os compostos contendo a forma N-amida (97% para a acetamida), incluindo os polímeros nitrogenados mais pesados, e diminuiu a degradação de hexosaminas (Yonebayashi & Hattori, 1980).

Da análise individual dos compostos orgânicos nitrogenados presentes nos quatro hidrolisados, constatou-se que na hidrólise da glicosamina em H1 ocorreram a menor recuperação de N-amônio e a maior de N-hexosamina (Tabela 3). Com o aumen-

TABELA 3. Percentagem de recuperação de frações orgânicas do N como N-amônio em função de variações no tempo de hidrólise de compostos nitrogenados utilizando HCl 1N sob refluxo.

Composto	Fração	Tempo (horas)				
		3	6	12	24	36
		----- % -----				
Glicosamina	N-amônio	9,8	9,8	9,9	9,9	10,0
	N-hexosamina	78,4	79,2	80,2	80,2	80,0
Quitina	N-amônio	3,1	3,5	4,5	5,0	6,7
	N-hexosamina	1,4	1,5	1,5	1,5	1,5

TABELA 4. Percentagem de recuperação de frações orgânicas do N como N-amônio em função de variações na concentração do ácido (HCl) e no tempo de hidrólise para o fracionamento de compostos nitrogenados padrões.

Composto	H 1 (HCl 1N/3 h) ¹			H 2 (HCl 3N/3 h)			H 3 (HCl 6N/4 h)			H 4 (HCl 6N/20 h)		
	N-AM	N-HE	N-AA	N-AM	N-HE	N-AA	N-AM	N-HE	N-AA	N-AM	N-HE	N-AA
----- % -----												
Glicosamina	9,8	78,4	0,0	13,5	55,5	0,1	36,4	54,1	0,32	44,8	50,5	0,45
Quitina	3,1	1,4	-	6,6	22,4	-	14,1	48,6	0,6	29,5	41,8	1,4
Asparagina	31,5	0,0	68,5	36,0	0,4	63,5	46,8	0,8	52,2	57,8	0,8	41,3
Acetamida	97,2	0,0	0,0	99,8	0,0	0,1	100,0	0,0	0,4	100,0	0,0	0,9

¹N-AM = N-amônio; N-HE = N-hexosamina; N-AA = N- α -amino.

to da concentração de HCl nos hidrolisados subsequentes (H2, H3 e H4), houve um aumento da forma N-NH₄⁺ às expensas da degradação dos açúcares aminados. A maior recuperação total da quitina (N-NH₄⁺ + N-hexosamina) ocorreu quando se alterou a concentração de HCl 1N (H1) para 6N (H3). Contudo, além da maior concentração do ácido houve um acréscimo de 33% no tempo de hidrólise em H3 (Tabela 4). Entre H3 e H4, não houve diferença de concentração do ácido, apenas no tempo de hidrólise. Observa-se, na Tabela 4, o efeito consistente desse na degradação de N-hexosaminas.

Na recuperação da asparagina, verificou-se que de H1 para H4 ocorreu um aumento de 26,3% no conteúdo de N-NH₄⁺ (de 31,5 para 57,8) e uma di-

minuição de 27,2% (68,5 para 41,3) da forma N- α -amino (Tabela 4). Estes resultados demonstram a importância do tempo de hidrólise e da concentração de ácido sobre a degradação desse aminoácido. A extrapolação deste método para solos (Gonzalez-Prieto & Carballas, 1988; Camargo, 1996) tem demonstrado que ocorre uma baixa recuperação da fração N- α -amino. A degradação de aminoácidos é promovida por reações secundárias originadas pelo envolvimento da amostra a repetidos ciclos de aquecimento e resfriamento (Schnitzer & Hindle, 1981). Isso não ocorreu com acetamida, cuja recuperação na forma de N-NH₄⁺ no hidrolisado H1, foi de 97,2% (Tabela 4), não sendo afetada pelas demais condições hidrolíticas estudadas. De forma geral, essês

resultados, tanto para acetamida como para os demais compostos, são similares aos obtidos por Yonebayashi & Hattori (1980).

Com base nestes resultados, a hidrólise descrita por Bremner (1965) é insuficiente, dado o pouco tempo para degradação de compostos mais resistentes do N-orgânico, e, principalmente, porque a maior parte de N-amônio presente é derivada da degradação de hexosaminas. Esta constatação também foi verificada no solo quando se comparou o método proposto por Bremner (1965) com o de Yonebayashi & Hattori (1980) e com o método modificado de Gonzalez-Prieto & Carballas (1988) (Tabela 5). Os valores obtidos pela hidrólise com HCl 6N durante doze horas foram significativamente inferiores aos obtidos com a utilização de HCl 6N por 24 horas, suspeitando-se que o elevado conteúdo de N-amônio (23,7%) seja proveniente da fração N-hexosamina. Dessa forma, os valores de N-hexosamina são subestimados pelo método de Bremner (4,6%).

Os estágios hidrolíticos descritos por Gonzalez-Prieto & Carballas (1988) mostram que cerca de 70% do N hidrolisado (52,9/76,0) foi recuperado nos dois primeiros estágios (H1 e H2), o que caracteriza uma vantagem do método em relação aos demais. A princípio, esta alta recuperação demonstra o caráter lábil das frações em H1 e H2 e a recalitrância das frações residuais em H3 e H4 (Gonzalez-Prieto & Carballas, 1988). Apesar desta vantagem, há a subestimação da fração N- α -amino, que foi relatada por Schnitzer & Hindle (1981) como uma limitação do método. A forma N- α -amino é afetada pelos

repetidos ciclos de aquecimento e resfriamento a que a amostra é submetida. Como consequência, ocorrem interações secundárias com a formação de compostos nitrogenados complexos que dificultam a hidrólise e modificam os produtos finais, fato constatado pelo aumento da fração N-não identificado (Tabela 5). Esta limitação pode ser sanada com a inclusão de uma segunda hidrólise com ácido propiônico, que aparentemente aproximaria o HCl das ligações menos acessíveis (Scotchler et al., 1970). Desta forma, o conhecimento da limitação de tempo e concentração de ácido em relação à degradação efetiva de polímeros nitrogenados e a não-decomposição de açúcares aaminados, conduzem à utilização de mais de uma hidrólise. Neste contexto, tanto o método hidrolítico desenvolvido por Yonebayashi & Hattori (1980) como o descrito por Gonzalez-Prieto & Carballas (1988) são satisfatórios para o fracionamento do N-orgânico. Informações semelhantes já foram apresentadas por Camargo (1996), ao compararem os três métodos descritos neste trabalho juntamente com mais três variações dos mesmos no fracionamento do N em dez solos do Rio Grande do Sul.

Neste trabalho, constatou-se que o método descrito por Gonzalez-Prieto & Carballas (1988) requer maior tempo de análise e custos financeiros mais elevados, dificultando sua aplicação como método de rotina para determinação das formas de N no solo. Os próprios autores, reconhecendo essas limitações, propuseram novo método simplificado em 1992 (Gonzalez-Prieto & Carballas, 1992).

TABELA 5. Variações na concentração de ácido (HCl) e no tempo de hidrólise influenciando o fracionamento do N-orgânico em um solo Podzólico Vermelho-Amarelo¹.

Tratamento	N-hidrolisado	N-não-hidrolisado	N-amônio	N-amida	N-hexosamina	N- α -amino	N-não-identificado	% N-Total	
H1 (HCl 1N/3h)	30,1		-	4,9	7,4	7,8	9,9		
H2 (HCl 3N/3h)	22,8		3,5		4,6	6,2	8,5		
H3 (HCl 6N/4h)	12,2		1,3		3,2	4,9	2,8		
H4 (HCl 6N/20h)	10,9		1,8		3,3	3,9	2,1		
Σ H (H1+H2+H3+H4)	76,0B	24,2B	6,6B	4,9	18,5B	22,8C	23,3A		
HCl 6N/24h	79,2A	20,8C	-	-	35,9A	27,0A	11,4C		
HCl 6N/12h	71,1C	28,9A	23,7A	4,9	4,6C	23,5B	19,3B		
DMS (1%)	0,269	0,303	0,408		0,502	0,437	0,907		
CV %	0,149	0,170	1,478		0,901	0,240	0,395		

¹ Letras maiúsculas idênticas não diferem estatisticamente a 1% de probabilidade pelo teste Tukey entre o somatório de hidrólises (Σ H-Gonzalez-Prieto & Carballas, 1988), a hidrólise de 24 h proposta por Yonebayashi & Hattori (1980) e a hidrólise de 12 h proposta por Bremner (1965).

CONCLUSÕES

1. A hidrólise contínua de doze horas com HCl 6N (Bremner, 1965) é insuficiente para degradar os polímeros nitrogenados de maior peso molecular, e promove a decomposição de açúcares aminados.

2. A decomposição da glicosamina e da quitina com HCl 6N é diretamente proporcional ao tempo de hidrólise, sendo que a 36 horas as porcentagens de recuperação dessas substâncias são, respectivamente, de 98 e 85%.

3. A extração com HCl 1N/3 h é adequada para determinação de N-hexosamina, porque há pouca decomposição de glicosamina a N-amônio. Nessas condições, ocorre pouca hidrólise da quitina a glicosamina.

4. As diferentes concentrações de ácido e tempo de hidrólise de até 20 horas proporcionam recuperações de 97 a 100% da fração N-amida.

5. A caracterização adequada de formas orgânicas nitrogenadas presentes no solo requer a utilização de mais de uma hidrólise, com tempo e concentrações diferentes.

REFERÊNCIAS

- BREMNER, J. M. Organic forms of nitrogen. In: BLACK, C.A. (Ed.). *Methods of soil analysis*. Madison: American Society of Agronomy, 1965. Part 2, p.1238-1255.
- BREMNER, J. M.; SHAW, K. Studies on the estimation and decomposition of amino sugar in soil. *Journal of Agriculture Science, Cambridge*, v.44, p.152-159, 1954.
- CAMARGO, F. A. de O. *Fracionamento e dinâmica do nitrogênio orgânico em solos do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996. 151p. Tese de Doutorado.
- 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, p.1-6, 1988.
- GONZALEZ-PRIETO, S.J.; CARBALLAS, T. Simple step-wise acid hydrolysis method for the fractionation of soil organic nitrogen. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.24, p.925-926, 1992.
- GONZALEL-PRIETO, S.J.; CARBALLAS, M.; CARBALLAS, T. First results on the effect of number of stages on the hydrolytic analysis of the distribution of nitrogenated organic compounds in cattle slurry. *Anales de Edafología y Agrobiología*, Madrid, v.43, n.7, p.1243-1246, 1984.
- JANEL, P.; JOCTEUR MONROZIER, L.; TOUTAIN, F. Caracterization de l'azote des litières et des sols par hydrolyse acid. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v.11, p.141-146, 1979.
- SAS INSTITUTE. *SAS user's guide*. Cary, 1990. 690p.
- 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, p.237-243, 1981.
- SCOTCHLER, J.; LOZIER, R.; ROBINSON, A.B. Cleavage of single amino acid residues from Merrifield resin with hydrogen chloride and hydrogen fluoride. *Journal of Organic Chemistry*, New York, v.35, p.3151-3152, 1970.
- STEVENSON, F.J. Organic forms of soil nitrogen. In: STEVENSON, F. J. (Ed.). *Nitrogen in agricultural soils*. Madison: American Society of Agronomy, 1982. p.67-122.
- TEDESCO, M.J.; VOLKWEISS, S.J.; BOHNEM, H. *Análises de solo, plantas e outros materiais*. Porto Alegre: UFRGS, Faculdade de Agronomia, Departamento de Solos, 1985. 188p. (Boletim técnico, 5).
- YONEBAYASHI, H.; HATTORI, T. Improvements in the method for fractional determination of soil organic nitrogen. *Soil Science and Plant Nutrition*, Tokyo, v.26, p.469-481, 1980.

