

UFRRJ

**INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

DISSERTAÇÃO

**Efeito da Adição de NBPT, Zeólita e Ácido Húmico
na Atividade da Urease**

Mateus de Paula Gomes

2015



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
CIÊNCIA DO SOLO**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE NBPT, ZEÓLITA E ÁCIDO HÚMICO NA
ATIVIDADE DA UREASE**

Mateus de Paula Gomes

Sob a Orientação do Professor
Everaldo Zonta

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre**, no Curso de Pós-
Graduação em Agronomia, Área de
Concentração em Ciência do Solo

Seropédica, RJ
julho de 2015

Gomes, Mateus de Paula, 1988-
Efeito da adição de NBPT, zeólita e ácido húmico na atividade da urease
/Mateus de Paula Gomes. – 2015.
f. : il.

Orientador: Everaldo Zonta.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Instituto de Agronomia.
Bibliografia: f. .

É permitida a cópia parcial ou total desta Dissertação, desde que seja citada a fonte.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE AGRONOMIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - CIÊNCIA DO SOLO**

MATEUS DE PAULA GOMES

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no Curso de Pós-Graduação em Agronomia, área de Concentração em Ciência do Solo.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 28/07/2015

Everaldo Zonta Dr. UFRRJ
Orientador

Juliano Bahiense Stafanato,
Dr. UFRRJ

Paulo César Teixeira,
Dr. EMBRAPA SOLOS

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder saúde e me guiar.

Aos meus pais, João e Rita, que sempre estiveram ao meu lado e apoiaram minhas decisões.

À minha irmã, Débora, pelo apoio em todos os momentos vividos.

À minha namorada, Ariana, pelo companheirismo e por se manter ao meu lado mesmo a distância, sempre me incentivando e me ajudando.

Ao meu tio José Marcio “*in memoriam*”, que sempre acreditou no meu potencial.

Aos demais familiares, que sempre torceram por mim e me ajudaram nos momentos em que precisei.

A todos os meus amigos, companheiros de toda a vida, em especial aos meus companheiros de república, que se tornaram minha segunda família.

Ao meu orientador, professor Everaldo Zonta, pelo apoio e ensinamentos.

Aos colegas da pós-graduação, por me acolherem.

Aos demais professores do CPGA-CS, que se dedicam aos seus alunos.

Aos funcionários do CPGA-CS e da UFRRJ, pelos serviços prestados.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa que me permitiu seguir com os estudos.

À PETROBRAS, por fornecer os fertilizantes aditivados com NBPT.

À Gabriela, por me ceder os fertilizantes aditivados com ácido húmico e zeólita.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desta conquista, meus sinceros agradecimentos!

*“Ainda que eu ande pelo vale
da sombra da morte, não
temerei mal algum, pois tu
estás comigo; a tua vara e o
teu cajado me protegem.”*

(Salmos 23:4)

Biografia

Mateus de Paula Gomes, filho de Rita de Cássia Paula Gomes e João Lúcio Gomes, nascido em Viçosa, estado de Minas Gerais, em 27 de abril de 1988. Concluiu o ensino médio na Escola Estadual Maria Aparecida David (Canaã, MG) em 2005. Em 2006, iniciou o curso de Cooperativismo e em 2009 ingressou no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa, concluindo em 2014 e ingressando no curso de Pós-Graduação em Agronomia – Ciência do Solo ao nível de mestrado, no Departamento de Solos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

RESUMO

Gomes, Mateus de Paula. **Efeito da Adição de NBPT, zeólita e ácido húmico na atividade da urease**. 2015. 53f. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Dentre os fertilizantes nitrogenados, a ureia se destaca devido as suas vantagens como alto teor de N, baixo custo por unidade do nutriente e compatibilidade com outros produtos de uso agrícola, porém a facilidade de perdas do nitrogênio aplicado via ureia reduzem a eficiência do fertilizante e comprometem a sustentabilidade dos empreendimentos agrícolas que optam pela fertilização nitrogenada via ureia. A enzima urease é responsável por catalisar a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono, onde a amônia pode ser perdida por volatilização, sendo essa a principal causa das perdas do nitrogênio aplicado ao solo. Diversos estudos avaliam formas de reduzir essas perdas, através de técnicas de cultivo ou inibição da enzima urease. Objetivou-se com este estudo, avaliar a influência da adição de NBPT, ácido húmico e zeólita, em concentrações crescentes, na atividade da enzima urease. O estudo foi conduzido em laboratório, no Departamento de Solos da UFRRJ, em que foram utilizados 15 fertilizantes a base de ureia, sendo cinco deles com NBPT, três com zeólita, três com ácido húmico, três com ácido húmico mais zeólita e um de ureia pura. A atividade enzimática foi determinada através dos métodos propostos por May & Douglas (1976) e Witte & Medina-Escobar (2001). Ambos os métodos determinam a atividade enzimática através da formação de NH_3 , porém diferem quanto à fonte enzimática e forma de determinar a amônia. Os dois métodos confirmam a eficiência do NBPT em inibir a atividade da urease, mesmo no menor período de incubação e na menor concentração, sendo o mais eficiente, dentre os compostos testados. As diferentes concentrações do NBPT não resultaram em diferença na atividade da enzima urease. Os resultados obtidos por meio do método proposto por May & Douglas (1976) mostram que o ácido húmico reduziu a atividade enzimática após 36 horas de incubação. A zeólita não exerce influência na atividade da urease, quando analisada pelo método de May & Douglas (1976).

Palavras chave: Volatilização de amônia, Hidrólise da ureia, Perdas de nitrogênio.

Gomes, Mateus de Paula. **The influence of NBPT, zeolite and humic acid on urease activity**. 2015. 53f. Dissertation (M Science in Agronomy, Soil Science). Institute of Agriculture, Department of Soil Science, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Among the nitrogen fertilizers, urea stands out due to its advantages such as high N, low cost per unit of nutrient and compatibility with other products for agricultural use, but the ease of nitrogen losses applied via urea reduce fertilizer efficiency and compromise the sustainability of agricultural enterprises opting for nitrogen fertilization via urea. The urease enzyme is responsible for catalyzing the hydrolysis of urea into ammonia and carbon dioxide, where the ammonia can be lost by volatilization, which is the main cause of loss of nitrogen applied to the soil. Several studies evaluating ways to reduce these losses through plant breeding or inhibiting the urease enzyme. The objective of this study was to evaluate the influence of the addition of NBPT, humic acid and zeolite, in increasing concentrations in the enzyme urease activity. The study was conducted in the laboratory in the Department of Soil Science of UFRRJ, they were used 15 fertilizer urea-based, five of them with NBPT, three with zeolite, three with humic acid, three with humic acid over zeolite and urea pure. The enzymatic activity was determined by the methods proposed by May & Douglas (1976) and Witte & Medina-Escobar (2001). Both methods determine the enzymatic activity through the formation of NH_3 , but differ in the enzyme source and determining the form of ammonia. Both methods confirmed the efficiency of NBPT to inhibit urease activity even in the shortest incubation period and the lowest concentration being the most effective among the tested compounds. NBPT different concentrations did not result in differences in the enzyme urease activity. The results obtained by the method proposed by May & Douglas (1976) show that humic acids reduced enzymatic activity after 36 hours incubation. The zeolite has no influence on the activity of urease, when analyzed by the method of May & Douglas (1976).

Keywords: Ammonia volatilization, hydrolysis of urea, nitrogen losses.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo da reação de Berthelot proposto por Harfmann & Crouch (1989) (Ferreira, 2007).	13
Figura 2 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 2 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.	17
Figura 3 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 4 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.	18
Figura 4 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 6 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.	18
Figura 5 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 24 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.	19
Figura 6 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 36 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.	19
Figura 7 - Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 2 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.	24
Figura 8 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 4 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.	25
Figura 9 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 6 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.	25
Figura 10 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 24 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.	26
Figura 11 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 36 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.	26

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Sequência de seletividade entre íons, de algumas classes de zeólitas (Shinzato et al., 2007).....	7
Tabela 2 - Caracterização química das amostras de solo coletadas na profundidade de 0–20 cm.	11
Tabela 3 – Atividade relativa da urease, sendo o resultado da ureia convencional dado como 100 %. Letras diferentes dentro das colunas indicam diferenças pelo teste Scott-Knott a 5 %.	16
Tabela 4 – Valores de pH para as soluções incubadas como descrito por May & Douglas (1976), antes e após os períodos de reação.....	20
Tabela 5 - Modelos de regressão e coeficientes de determinação ajustados.....	22
Tabela 6 – Atividade relativa da urease, sendo o resultado da ureia convencional dado como 100 %. Letras diferentes dentro das colunas indicam diferenças pelo teste Scott-Knott a 5 %.	23
Tabela 7 - Valores de pH para as soluções incubadas como descrito por Witte & Medina-Escobar (2001), antes e após os períodos de reação.....	24
Tabela 8 - Modelos e coeficientes de determinação ajustados.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos.....	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Utilização do NBPT para Reduzir a Volatilização de Amônia	3
2.2 Utilização de Ácidos Húmicos para Reduzir a Volatilização de Amônia.....	5
2.3 Utilização de Zeólita para Reduzir a Volatilização de Amônia.....	6
3 MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Extração do Ácido Húmico e confecção dos fertilizantes aditivados.....	10
3.2 Metodologia para análise da atividade da urease proposta por May & Douglas (1976)....	11
3.3 Metodologia para análise da atividade da urease proposta por Witte & Medina-Escobar (2001)	12
3.4 Análise Estatística.....	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 Resultados obtidos por meio do método de May & Douglas (1976)	15
4.1.2 NBPT	15
4.1.2 Ácido húmico.....	20
4.1.3 Zeólita	21
4.1.4 Análise da atividade enzimática ao longo do tempo	21
4.2 Resultados obtidos por meio do método de Witte & Medina-Escobar (2001).....	22
4.2.1 NBPT	22
4.2.2 Ácido húmico	23
4.2.3 Análise da atividade enzimática ao longo do tempo	27
5 CONCLUSÕES	28
6 BIBLIOGRAFIA	29

1 INTRODUÇÃO

A população mundial continuará em crescimento durante as próximas décadas e também a demanda por alimentos, o que expõe o desafio de elevar a produção mundial de alimentos em um contexto de recursos naturais escassos. O desenvolvimento de técnicas de cultivos mais eficientes e de plantas com genótipos mais produtivos contribui consideravelmente para o avanço agrícola, contudo o uso adequado de fertilizantes é uma das principais estratégias para se obter altas produtividades. O consumo global de fertilizantes deverá crescer 1,8 % ao ano até 2018, gerando um aumento de 25 % em relação a 2008. Os fertilizantes nitrogenados deverão ter um acréscimo de 1,4 % ao ano, sendo que na América Latina e Caribe o incremento anual deverá ser de 3,3 % (FAO, 2015).

A ureia é o fertilizante mais utilizado na agricultura (Sousa & Silva, 2009), devido ao seu elevado teor de nitrogênio, baixo custo por unidade do nutriente (Urquiaga & Malavolta, 2002) e compatibilidade com diversos pesticidas utilizados na agricultura, tendendo a permanecer como principal fertilizante nitrogenado sólido no mercado mundial (Soares, 2011). Porém sua eficiência é reduzida, devido principalmente às perdas por volatilização de amônia, que reduzem o aproveitamento do nitrogênio aplicado. As perdas de N por volatilização de NH_3 , em condições extremas, podem ultrapassar os 70 % (Lara Cabezas et al., 1997; Cantarella, 2007a).

A enzima urease, responsável pela hidrólise da ureia, é encontrada em quase todos os tipos de solo, em concentrações que variam com o tipo de solo e teor de matéria orgânica, dentre outras características edafoclimáticas. Os fatores que influenciam na atividade microbiológica do solo também influenciam a atividade da urease, e consequentemente nas taxas de volatilização de amônia (Reynolds & Wolf, 1987). Fatores como as condições climáticas, CTC e capacidade de tamponamento do pH também afetam diretamente o processo de volatilização (Sangoi et al., 2003; Costa et al., 2003; Cantarella et al., 2008; Lanna et al., 2010 apud Okumura & Mariano, 2012).

Diante deste cenário, os esforços têm se concentrado na redução das perdas do nitrogênio aplicado via ureia com o propósito de elevar a sustentabilidade da adubação nitrogenada e consequentemente dos empreendimentos agrícolas.

Diversos estudos têm avaliado a redução da volatilização de amônia por meio da adição de compostos que inibem a enzima urease. A adição de micronutrientes, especialmente cobre e boro, de produtos acidificantes e de polímeros que interferem na solubilização e, ou, hidrólise da ureia são objetos de vários estudos, porém o tratamento da ureia com o inibidor NBPT tem destaque na comunidade científica devido aos bons resultados encontrados (Bremner & Chai, 1986).

Considerando que a volatilização de amônia reduz com o aumento da CTC do solo, tem-se avaliado a mistura de ureia com produtos de elevada CTC (Monte & Resende, 2005), como as zeólitas e, ou, ácidos húmicos como alternativa contra a volatilização de amônia, sendo que alguns resultados promissores já foram obtidos (Reháková et al., 2004; Bernardi et al., 2007; Paiva, 2009; Yusuff et al., 2009; Bautista et al., 2011). Porém, são escassos os estudos da influência desses compostos na atividade da urease.

1.1 Objetivos

Objetivou-se com este estudo avaliar a influência da adição de NBPT, zeólita e ácido húmico à ureia, sobre a atividade da enzima urease.

Determinar a eficiência das diferentes doses dos inibidores.

Comparar os métodos de avaliação da atividade da urease propostos por Witte & Medina-Escobar (2001) e May & Douglas (1976).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Utilização do NBPT para Reduzir a Volatilização de Amônia

A urease é a única metaloenzima Ni-dependente em eucariotos, que catalisa a hidrólise da ureia em amônia e dióxido de carbono, permitindo que esses organismos utilizem a ureia como fonte de nitrogênio (Andrews et al., 1984). Pertencente ao grupo das hidrolases, a urease é encontrada em praticamente todos os tipos de solos e é relativamente persistente devido ao fato de ficar protegida da ação de outras proteases no interior dos agregados do solo (Palucci, 2004).

O tratamento dos fertilizantes a base de ureia com inibidores da enzima urease é uma das alternativas para reduzir as perdas de nitrogênio por volatilização de amônia (Cantarella et al., 2008).

Os inibidores da urease podem ser classificados em substratos análogos estruturais e inibidores que afetam o mecanismo da reação (Upahyay, 2012), ambas as classes atuam retardando as reações que levam à volatilização de NH_3 , aumentando a possibilidade de incorporação da ureia, pela chuva. Dentre os inibidores conhecidos, o NBPT vem sendo amplamente estudado, e tem obtido bons resultados (Bremner & Chai, 1986).

Características como solubilidade, difusividade e teor de nitrogênio similares à ureia (Watson, 2000), permitem que o [N-(n-butil) tiofosfórico triamida] (NBPT) bloqueie fortemente três sítios ativos da urease (Manunza et al., 1999), ocasionando uma desaceleração da atividade hidrolítica da enzima, resultando em menores perdas de NH_3 . A ureia tratada com este composto se solubiliza após ser aplicada ao solo e o NBPT precisa ser convertido ao seu análogo de oxigênio [N-(n-butil) fosfórico triamida] (NBPTO), que é o verdadeiro inibidor da urease (Christianson et al., 1990). A eficácia do NBPT depende não apenas da quantidade da enzima, mas também da taxa de conversão do NBPT a NBPTO, em contato com o solo e também das taxas de degradação dos dois compostos (Okumura & Mariano, 2012). A conversão do NBPT a NBPTO é rápida em solos bem arejados, ocorrendo em alguns minutos ou horas, porém pode levar vários dias em condições de solos inundados (Watson, 2000).

Os estudos sobre a volatilização de amônia proveniente da ureia divergem quanto ao período em que ocorre o pico de volatilização. Sangoi et al. (2003) relataram que o pico na volatilização ocorreu no 6º dia após a aplicação da ureia. Lanna et al. (2012) relatam a

máxima atividade enzimática, ocasionando pico de perda de NH_3 , registrada entre o 7° e o 8° dia após a aplicação do fertilizante em cobertura. Porém, Stafanato et al. (2013) encontraram o pico de volatilização de amônia após 48 horas da aplicação do fertilizante. A volatilização de NH_3 sofre grande influência das condições edafoclimáticas o que justifica as divergências dos resultados. A ocorrência de chuvas no período de três a sete dias após a aplicação do fertilizante potencializa a ação do inibidor, por incorporar a ureia ao solo, favorecendo a redução da perda do nitrogênio (Okumura & Mariano, 2012), porém mesmo com a ausência de chuvas é possível se obter redução da volatilização de NH_3 (Cantarella, 2007b).

As condições edafoclimáticas exercem grande influência também sobre a eficiência do inibidor. O NBPT perde eficiência em altas temperaturas, devido ao aumento na atividade da urease, ocasionando maior dissolução da ureia e maior evaporação da solução do solo, provocando a movimentação do NH_3 em direção à superfície, além de a taxa de hidrólise ultrapassar a taxa de conversão do NBPT a NBPTO (Rawluk et al., 2001, apud Okumura & Mariano, 2012). Bremner & Chai (1986) observaram diminuição da eficiência do NBPT com a elevação da temperatura de 10 °C para 40 °C, e esse efeito foi maior no período de 14 dias após a aplicação de N em comparação com os períodos de três a sete dias. Resultados similares foram relatados por Carmona et al. (1990), que verificaram aumento da hidrólise da ureia com a elevação da temperatura e com o passar dos dias, no entanto a elevação da hidrólise é maior na ausência e, ou, diminuição da concentração do inibidor, verificando que após 6 dias e a uma temperatura de 32 °C a hidrólise da ureia convencional foi de 99,3 %, já da ureia tratada com NBPT (0,10 %) apresentou 60,7 % de hidrólise, em consequência, a volatilização de NH_3 nesse mesmo período originou valores de 41,6 % (ureia convencional) e 9,9 % (ureia tratada com NBPT). Assim, em condições adversas e longos períodos de exposição do inibidor, são necessárias maiores concentrações de NBPT para alcançar os mesmos índices de inibição que seriam obtidos em condições favoráveis (Bremner & Chai, 1986; Schlegel et al., 1986; Carmona et al., 1990; Watson et al., 1994).

Carmona et al. (1990) e Zhengping et al. (1996) indicam que após 6 a 7 dias, aplicado em condições de temperatura variando de 25 °C a 32 °C, mais de 50 % do nitrogênio proveniente da ureia é perdido por volatilização de NH_3 , ao utilizar ureia tratada com NBPT essa perda é de 10 a 20 %. Soares et al. (2012) observaram redução de até 78 % nas perdas por volatilização de amônia da ureia tratada com NBPT. As maiores concentrações do inibidor resultam em maiores reduções na volatilização da amônia. Carmona & Christianson (1990) obtiveram redução de 68 a 84 % ao adicionar 0,1 % de NBPT à ureia, quando a

concentração do inibidor foi de 0,01 % as perdas de amônia foram de 1,5 a 3 vezes maiores que na ureia pura.

Scivittaro et al. (2010) encontraram perdas de 15 % do N aplicado, devido a volatilização de amônia, em condição de solo saturado e perdas de 22 % do N aplicado em condição de solo seco. Quando o intervalo entre a aplicação da ureia tratada com NBPT e o início da irrigação foi de 10 dias, as perdas foram reduzidas em 83 e 88 %, para as condições de solo saturado e úmido, respectivamente. O uso do NBPT proporcionou maiores produtividade de grãos e maior acumulação de nitrogênio pela planta de arroz quando a aplicação de N em cobertura antecedeu em 10 dias o início da irrigação, indicando que o tratamento da ureia com NBPT possibilita que sua aplicação anteceda em até 10 dias o início da irrigação, sem prejuízos para a produtividade de grãos e a acumulação de nitrogênio pela planta de arroz.

Apesar dos benefícios, Watson (2000) atenta para a possibilidade de fitotoxicidade associada ao uso de NBPT, que seria causada pela absorção de ureia pelas plantas, o que provoca queima na ponta das folhas. Não se sabe se o problema é consequência direta da toxicidade da ureia ou um efeito indireto, porém, sabe-se que este problema é transitório e ocorre em casos em que altas doses de ureia e inibidor são utilizadas.

2.2 Utilização de Ácidos Húmicos para Reduzir a Volatilização de Amônia

Os ácidos húmicos são macromoléculas complexas, de elevado peso molecular, originários da degradação química e biológica de plantas e resíduos de origem animal e células microbianas (Hayes & Wilson, 1997), que devido às características como elevada CTC, caráter ácido e elevado poder tampão (Weil & Magdoff, 2004; Silva & Mendonça, 2007) têm sido testados como alternativas na tentativa de reduzir as perdas de N derivado da volatilização de amônia, porém, tais estudos ainda são escassos (Paiva, 2009).

A grande quantidade de grupamentos fenólicos presentes nas substâncias húmicas indica a possibilidade de tais substâncias influenciarem na atividade da urease, uma vez que o fenol é inibidor desta enzima (Bremner & Ahmad, 1995). Além disso, a redução do pH ocasionada pela presença dos ácidos húmicos pode interferir na atividade enzimática, visto que a urease possui atividade máxima em pH próximo de 8 (Longo & Melo, 2005).

Estudando o efeito de ácidos húmicos obtidos de carvão, Paiva (2009) não encontrou relação entre os ácidos húmicos e a inibição da atividade da urease em análises *in vitro*.

Porém, o recobrimento do grânulo da ureia com AH não só retardou o início da volatilização, como também reduziu o pico máximo da volatilização de NH_3 .

Yusuff et al. (2009) obtiveram redução de 36 % na volatilização de amônia com o tratamento da ureia com ácido húmico obtido de turfa. Guimarães (2011) obteve menores taxas de volatilização de amônia ao utilizar ureia granulada com 20 % de ácido húmico e ureia granulada com 15 % de substâncias húmicas, porém ao utilizar ureia granulada com 5 % de ácido húmico ou 5 % de substância húmica os picos de volatilização foram maiores. Ao comparar os resultados das ureias granuladas com ácido húmico ou substância húmica com os resultados das ureias revestidas com esses mesmos compostos, o autor relata picos mais intensos de volatilização das ureias revestidas.

2.3 Utilização de Zeólita para Reduzir a Volatilização de Amônia

As zeólitas são um grupo de minerais aluminossilicatados, cristalinos, hidratados, de ocorrência natural, formadas por estruturas tridimensionais de tetraedros de SiO_4 e de AlO_4 , ligados entre si pelos quatro vértices de oxigênio. Essa configuração lhes confere cargas negativas, que são compensadas por cátions intersticiais de metais alcalinos ou alcalinos-terrosos. A Tabela 1 apresenta a série de seletividade de cátions de algumas zeólitas (Shinzato, 2007).

Existem mais de 52 espécies de zeólitas distribuídas em 38 tipos de estruturas diferentes (Passaglia & Sheppard, 2001) e mais de 150 espécies já foram sintetizadas em todo o mundo (Flanigen, 1981), cada espécie possui algumas características próprias. Os tetraedros de AlO_4 e SiO_4 formam anéis ao se unirem, que compõem um sistema de canais, cavidades e poros (Ming & Mumpton, 1989), com alta afinidade pelo NH_4^+ , que protegem esse íon da nitrificação por organismos e das perdas por volatilização (Reháková et al., 2004). A zeólita conserva o amônio ao diminuir a concentração do íon na solução, por meio da troca catiônica, retendo grandes quantidades de NH_4^+ , além de interferir no processo de nitrificação (Bartz & Jones, 1983; Ferguson & Pepper, 1987 apud Bernardi et al., 2007).

A estrutura na forma de canais e cavidades interconectados proporciona estabilidade da estrutura cristalina, elevada CTC, capacidade de captura de gases e de vapores, propriedades catalíticas e alto grau de hidratação (Ming & Mumpton, 1989). Devido a isso, as zeólitas retêm o amônio nas cargas superficiais e o gás amônia em suas cavidades (Bernal et al., 1993; Bautista et al., 2011).

Tabela 1 – Sequência de seletividade entre íons, de algumas classes de zeólitas (Shinzato et al., 2007).

Zeólita	Seletividade entre íons analisados	Referência
Clinoptilolita-Na	Pb>Cd>Cs>Cu>Co>Cr ³⁺ >Zn>Ni>Hg	Zamzow et al. (1990)
Clinoptilolita-Na	Pb>Cu>Cd>Zn>Cr>Co>Ni	Ouki & Kavanagh (1997)
Clinoptilolita-Na	Pb>Cd	Curkovic et al. (1997)
Clinoptilolita	Pb>Cd>Ba>Sr>Cs>Ni	Faghihian et al. (1999)
Clinoptilolita-Na	Pb>Ba>Cd>Sr>Cs>Ni	Faghihian et al. (1999)
Clinoptilolita	Pb>Cu>Zn>Cd	Yuan et al. (1999)
Clinoptilolita-Na	NH ₄ ⁺ >Pb>Na>Cd>Cu≈Zn	Langella et al. (2000)
Clinoptilolita	Pb>Cr ³⁺ >Fe ³⁺ >Cu	Inglezakis et al. (2002)
Clinoptilolita	Co>Cu>Zn>Mn	Erdem et al. (2004)
Clinoptilolita-Na	Pb>Cr ³⁺ >Cd>Ni	Mozgawa & Bajda (2005)
Clinoptilolita	Pb>Cd>Cu	Kleinübing (2006)
Clinoptilolita-NH ₄	Pb>Cu>Ni>Cd	Sprynskyy et al. (2006)
Clinoptilolita-Na	Pb>Cu>Cd≈Zn	Cincotti et al. (2006)
Clinoptilolita	Cu>Cd>Zn>Ni>As>Cr	Geç-Fuhrman (2007)
Clinoptilolita	Cd>Ni>Cu	Kocaoba et al. (2007)
Clinoptilolita-H	Zn>Pb>Cd	Castaldi et al. (2008)
Mordenita	Pb>Cu>Cd>Zn	Yuan et al. (1999)
Mordenita	Pb>Cu>Zn	Pitcher et al. (2004)
Mordenita	Pb>Cr ³⁺	Shinzato et al. (2009)
Cabazita-Na	Pb>Cd>Zn>Co>Cu>Ni>Cr	Ouki & Kavanagh (1997)
Escolecita	Cr ³⁺ >Cd>Ni>Mn	Jimenez et al. (2004)
Escolecita	Cr>Mn>Cd>Ni	Bosco et al. (2005)

O uso da zeólita tem efeito variado em função do tipo de solo, Bouzo et al. (1994) observaram que foi necessário aumentar a quantidade do mineral à medida que a fertilidade do solo e o teor de argila aumentavam para se obter melhoria na produtividade da cana de açúcar, e a adição de 6 t ha⁻¹ de zeólita na linha de plantio triplicou a produtividade desta cultura.

Bernardi et al. (2007) obtiveram resultados de produtividade de milho 12 e 27 % maiores que o tratamento controle ao aplicar 200 kg ha⁻¹ de N (via ureia), misturado com 25 % de zeólita natural e concentrada, respectivamente. Ao elevar as proporções da mistura de zeólita com ureia os ganhos de produtividade foram menos intensos, estando na ordem de 5 a 7 % e de 10 a 12 % para a zeólita natural e a concentrada, respectivamente.

Crespo (1989) observou que 180 g de zeólita adicionada aos vasos de plantio, aumentaram em torno de 130 % a eficiência do uso e da extração de N, melhorando a produção de matéria seca de *Brachiaria decumbens*. Carrion et al. (1994) obtiveram maiores frutos de pepino ao adicionar 25 % de zeólita à formulação de NPK na proporção de 6,3:9:12, aplicado na dose de 745 kg ha⁻¹. Giacomini et al. (2014) reduziram as perdas de N por volatilização de NH₃ durante a compostagem de dejetos de suínos utilizando zeólitas naturais misturadas aos dejetos.

Werneck (2008) e Bernardi et al. (2010) mostraram que o uso de minerais aluminossilicatados do grupo das zeólitas em associação com a ureia, nas adubações, aumentaram a eficiência agronômica do N nas culturas da roseira e da aveia, pela diminuição das perdas de NH₃ por volatilização. Alves et al. (2007) verificaram que a adição de 25 % de zeólita à ureia proporcionou as menores perdas de nitrogênio por volatilização de amônia, em comparação com as perdas dos tratamentos com ureia pura.

Porém, não existem estudos dos efeitos desses minerais sobre a atividade da urease.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Laboratório de Interações Solo Planta (LSP) do Departamento de Solos do Instituto de Agronomia da UFRRJ, onde a atividade da enzima urease, foi quantificada por meio dos métodos propostos por May & Douglas (1976) e Witte & Medina-Escobar (2001), com modificações, que serão detalhadas a seguir.

Utilizou-se como substrato para determinação da atividade da urease por meio do método proposto por May & Douglas (1976), soluções contendo ureia, que foram preparadas utilizando-se 15 fertilizantes, em que a ureia comum e as ureias revestidas com NBPT foram fornecidas pela PETROBRAS e os fertilizantes contendo ácido húmico e, ou, zeólita foram granulados como descrito no item 3.1. Os testes preliminares mostraram que a zeólita inviabiliza a determinação da atividade da enzima urease a partir da metodologia proposta por Witte & Medina-Escobar (2001) (dados não publicados), isto porque a zeólita se liga à amônia e, ou, amônio formados durante a hidrólise da ureia, impedindo a formação da coloração azul que é detectada através do espectrofotômetro. Devido a isso, a metodologia proposta por Witte & Medina-Escobar (2001) não foi utilizada para determinação da atividade da urease nos tratamentos que continham zeólita, sendo, portanto utilizados apenas os fertilizantes com NBPT, ácido húmico e a ureia comum.

Os fertilizantes utilizados como substrato foram:

1. Ureia perolada comercial.
2. Ureia perolada revestida com inibidor da urease NBPT a 0,02%.
3. Ureia perolada revestida com inibidor da urease NBPT a 0,03%.
4. Ureia perolada revestida com inibidor da urease NBPT a 0,04%.
5. Ureia perolada revestida com inibidor da urease NBPT a 0,06%
6. Ureia perolada revestida com inibidor da urease NBPT a 0,08%.
7. Ureia granulada com 5% de ácido húmico.
8. Ureia granulada com 10% de ácido húmico.
9. Ureia granulada com 20% de ácido húmico.
10. Ureia granulada com 5% de zeólita.
11. Ureia granulada com 10% de zeólita.
12. Ureia granulada com 20% de zeólita.
13. Ureia granulada com 5% de ácido húmico e 15% de zeólita.

14. Ureia granulada com 15% de ácido húmico e 5% de zeólita.
15. Ureia granulada com 10% de ácido húmico e 10% de zeólita.

3.1 Extração do Ácido Húmico e confecção dos fertilizantes aditivados

O ácido húmico foi obtido a partir de turfa, que foi preparada pela secagem do material em estufa a 40° C e passagem em peneira de 60 mesh. Foram pesadas 80 g de turfa, dispostas em tubo de centrífuga de 1 L. Em seguida, adicionou-se, 800 mL da solução alcalina extratora de hidróxido de potássio (KOH), na concentração de 0,1 mol L⁻¹, determinando uma relação massa/volume (m/v) de 1:10. O material ficou em repouso por duas horas sendo centrifugado logo após. A escolha do hidróxido de potássio em detrimento ao hidróxido de sódio foi feita em função da adição do elemento K, tendo em vista que o produto final é o fertilizante. A determinação da concentração da solução e da relação massa/volume para o material do estudo foi estabelecida com base em testes prévios de avaliação da metodologia proposta. Outros fatores com potencial de interferir no processo de extração foram pré-estabelecidos segundo orientações de Rosa et al. (2000), sendo a extração realizada à temperatura ambiente (25 – 30 °C) e granulometria de 0,21 mm.

O processo de granulação dos fertilizantes foi realizado utilizando-se um disco granulador com diâmetro de 40 cm.

Inicialmente, os materiais utilizados na formulação dos fertilizantes foram moídos e passados em peneirados de 1 mm, para permitir melhor homogeneidade da mistura final e facilitar a granulação, possibilitando a obtenção de grânulos regulares a partir de materiais com granulometria fina.

As misturas foram preparadas utilizando ureia moída com as diferentes concentrações do ácido húmico e, ou zeólita. Foram realizadas misturas físicas, com auxílio de peneiras, de forma a facilitar a homogeneização dos componentes sólidos. A adição dos ingredientes em estado líquido foi realizada por borrifação sobre o ingrediente sólido previamente adicionado ao disco granulador durante o processo de granulação.

O fertilizante, ao ser retirado do prato foi peneirado e classificado quanto à dimensão dos grânulos, e estando entre 2 e 4 mm seguia para secagem a 45°C, em estufa de circulação forçada.

3.2 Metodologia para análise da atividade da urease proposta por May & Douglas (1976)

Este método para determinação da atividade da urease utiliza o solo como fonte da enzima, e a atividade enzimática é expressa em função da produção de NH_3 , produto da hidrólise da ureia.

Para a realização das análises utilizou-se amostras de um Argissolo Vermelho-Amarelo coletado em uma pastagem da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO), localizada no Km 47 da BR – 465, Seropédica, Rio de Janeiro.

O solo foi coletado na camada 0 – 20 cm e após a coleta foi seco ao ar. Posteriormente foi destorroado e peneirado em peneira com 1 mm de abertura. A descrição química do solo utilizado se encontra na Tabela 2.

Tabela 2 - Caracterização química das amostras de solo coletadas na profundidade de 0–20 cm.

pH	Ca ⁺²	Mg ⁺²	Al ⁺³	Na ⁺	K ⁺	H+Al	P	SB	T	V	C
	----- cmol _c dm ⁻³ -----						mg dm ⁻³	cmol _c dm ⁻³		%	g kg ⁻¹
5,1	1,2	1,6	0,3	0,0	3,6	3,4	4,5	2,9	6,5	45,1	15,3

Análises realizadas conforme descrito em EMBRAPA 1997.

Adicionou-se 3 g de solo seco ao ar em erlenmayers de 50 mL, em seguida adicionou-se 0,5 mL de tolueno e 12,0 mL de água deionizada. Procedeu-se a incubação a 30° C por 10 min, em estufa. Logo após, adicionou-se 3 mL da solução fertilizante contendo ureia na concentração de 0,1 mol L⁻¹, o que equivale a 0,2 mol L⁻¹ de N para todos os tratamentos, posteriormente os erlenmayers foram tampados e novamente incubados em estufa a 30 °C pelos períodos de 2, 4, 6, 24 e 36 horas. Após cada tempo de incubação, acrescentou-se 15 mL de solução de KCl 2 mol L⁻¹ com 5 mg de acetato de fenil mercúrio, agitou-se por 5 minutos e posteriormente procedeu-se a filtragem. A determinação do teor de N-amoniacoal trocável foi realizada pelo método de destilação a vapor (Bremner & Keeney, 1965).

May & Douglas (1976) indicam um período de quatro horas de incubação após a adição da solução fertilizante, porém, como este estudo visa analisar o efeito dos inibidores fez-se necessário a utilização de diferentes períodos de incubação, para o estudo do efeito do NBPT sobre a atividade da uréase é necessário um período maior de incubação, visto que a

eficiência desse composto é dependente da sua conversão a NBPTO, além disso, a utilização de períodos crescentes permite observar o efeito do inibidor ao longo do tempo.

As análises foram realizadas em triplicata, para cada tratamento realizou-se um branco, da maneira acima descrita, porém adicionando-se a solução fertilizante após a solução de KCl + acetato de fenil mercúrio. Do filtrado foram utilizados 10 mL para a destilação, em seguida, titulou-se com solução padronizada de ácido sulfúrico em concentração aproximada de 0,0025 mol L⁻¹.

3.3 Metodologia para análise da atividade da urease proposta por Witte & Medina-Escobar (2001)

O método descrito por Witte & Medina-Escobar (2001), utiliza a enzima urease purificada e a determinação de sua atividade também é feita a partir da formação de NH₃, quantificada por colorimetria através da reação de Berthelot, em que a amônia reage com um composto fenólico na presença de um agente oxidante e de um catalizador resultando em uma coloração azul intensa. O mecanismo da reação de Berthelot não está completamente esclarecido, dentre os mecanismos propostos, o mais aceito é descrito por Harfmann & Crouch (1989), mostrado na Figura 1.

O mecanismo é composto de três estágios. No primeiro a amônia reage com o hipoclorito para formar a monoclorimina. Em seguida, a monoclorimina reage com um fenol para formar a benzoquinonaclorimina e por último a benzoquinonaclorimina reage com outra molécula de fenol para formar o azul de indofenol (Searle, 1984).

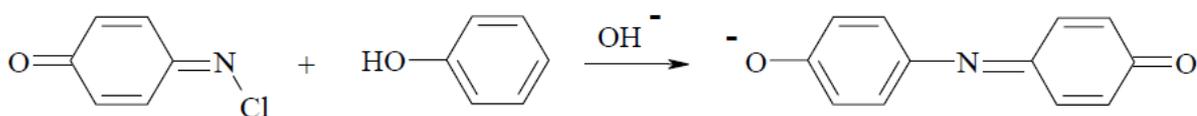
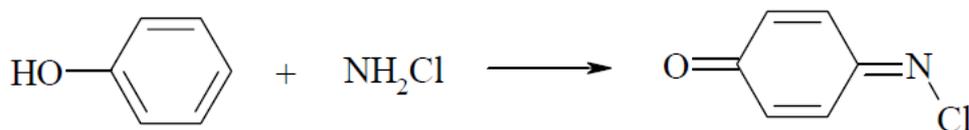
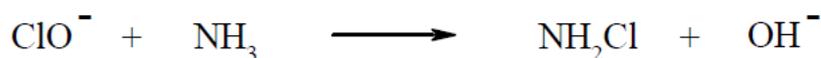


Figura 1 – Mecanismo da reação de Berthelot proposto por Harfmann & Crouch (1989) (Ferreira, 2007).

As soluções necessárias para a realização das análises foram previamente preparadas e armazenadas como descrito:

Solução A:

Dissolveu-se 7 g de fenol e 34 mg de nitroprussiato de sódio em 80 mL de água destilada. O volume foi completado para 100 mL e a solução foi armazenada a 4 °C, protegida da luz.

Solução B:

Dissolveu-se 2,96 g de NaOH em 140 mL de água destilada, posteriormente acrescentou-se 29,74 g de Na₂HPO₄.12H₂O e a solução foi agitada até que os reagentes dissolvessem totalmente, em seguida, adicionou-se 40 mL de NaOCl (4 – 6 %). O pH foi ajustado para 12 e o volume completado para 200 mL. A solução foi armazenada em temperatura ambiente e protegida da luz.

Após o preparo das soluções, as análises foram divididas em duas etapas, em que as concentrações de todos os reagentes foi duas vezes maior que a utilizada por Witte & Medina-Escobar (2001), para que o volume final fosse adequado para preencher a cubeta, durante a leitura no espectrofotômetro.

Etapa 1:

No preparo da solução enzimática utilizou-se 3,6 mg de urease (Urease-U1500) de *Canavalia ensiformis* adquirida da Sigma Chemical Company, dissolvida em um litro de água destilada

Adicionou-se 520 µL da solução enzimática e 80 µL da solução com o fertilizante contendo ureia a 1 mol L⁻¹, equivalendo a 2 mol L⁻¹ de N em cada tubo de ensaio que, foram agitados e deixados em banho maria a 43 °C durante os intervalos de reação preestabelecidos (2, 4, 6, 24 e 36 horas, a concentração da ureia foi a mesma para todos os tratamentos).

Etapa 2:

Posteriormente, pipetou-se 80 µL da amostra juntamente com 3920 µL de água destilada, 40 µL do reagente A e 400 µL do reagente B. Os tubos foram tampados imediatamente após a adição do reagente B para evitar perda de amônia. Posteriormente os tubos foram agitados e deixados em banho maria a 50 °C durante 20 min para que a solução desenvolvesse cor. Ao fim do banho maria os tubos permaneceram por uma hora e meia em repouso em temperatura ambiente, para que as soluções estabilizassem.

Para a construção da curva de calibração, misturou-se 200 μL de solução de cloreto de amônio nas concentrações de 0, 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com 800 μL de água, que foram submetidos à etapa 2.

As análises foram realizadas em triplicata e o amônio foi determinado a partir das leituras de absorvância em espectrofotômetro, utilizando o comprimento de onda de 636 nm.

3.4 Análise Estatística

As análises foram realizadas em delineamento de blocos casualizado em parcelas subdivididas, sendo os períodos de incubação as parcelas e os fertilizantes as subparcelas. Os resultados foram submetidos ao teste F e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5 %, por meio do programa SISVAR versão 5.3. Além disso, foram ajustadas equações de regressão para o amônio acumulado ao longo do tempo, para caracterizar a cinética enzimática.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As metodologias para análise da atividade da enzima urease apesar de completamente distintas apresentaram resultados concordantes. O método de análise proposto por May & Douglas (1976) é mais demorado, devido à forma de determinação da amônia ser por destilação, porém, utilizar o solo como fonte da enzima pode ser uma vantagem, dependendo do estudo a ser conduzido. O método proposto por Witte & Medina-Escobar (2001) é mais rápido e prático, devido à determinação da amônia ser por colorimetria, porém, o período de repouso após a segunda etapa interfere nos resultados, uma vez que se o tempo for muito curto a reação de Berthelot continua a acontecer, aumentando os valores da absorvância para os tratamentos, e, ou repetições seguintes.

4.1 Resultados obtidos por meio do método de May & Douglas (1976)

4.1.2 NBPT

Os fertilizantes aditivados com NBPT resultaram em baixos valores de amônio em solução e após duas horas de incubação (Figura 2) o composto já exercia ação inibitória sobre a enzima.

A eficiência do NBPT depende de sua taxa de conversão ao seu análogo de oxigênio (NBPTO), que depende de fatores bióticos e abióticos, porém os detalhes dessa reação ainda não são conhecidos (Watson et al., 2008). Ao analisar o efeito da temperatura sobre a inibição enzimática com uso do NBPT, Watson et al. (2008) relatam que a inibição da urease foi menor a 15 °C quando comparada com as temperaturas de 5 e 25 °C. No solo a conversão do NBPT a NBPTO é rápida em condições de boa aeração, porém pode demorar vários dias em condições de alagamento (Watson, 2000). Pro et al. (2014) sugerem que a substituição do enxofre pelo oxigênio na conversão dos compostos ocorre apenas no solo e provavelmente devido à ação de bactérias, porém em seus estudos o tempo de incubação foi de apenas 30 minutos, o que pode ter sido insuficiente para que a reação se iniciasse. Keerthisinghe & Freney (1994) relataram que o uso do NBPT teve pouco efeito sobre a taxa de hidrólise da ureia em solos alagados, indicando que em ambiente anaeróbico o composto teve baixa conversão ao seu análogo NBPTO, porém na presença de algas que forneciam O₂ a ureia permaneceu por mais tempo no solo, indicando maior eficiência do composto e

provavelmente maior conversão em seu análogo de oxigênio, já o NBPTO foi eficiente na redução da taxa de hidrólise mesmo quando aplicado diretamente sobre o solo alagado. Phongpan et al. (1995), ao aplicar NBPT sobre arroz inundado, encontraram perdas de N de 5,4 % para o tratamento com NBPT e 15 % para o controle após 9 dias da aplicação do fertilizante, porém a redução nas perdas de N teve início logo após o 1º dia de aplicação do fertilizante aditivado, sugerindo que a reação de conversão se iniciou rapidamente.

Não houve diferença na taxa de inibição entre as concentrações do composto a 5 % pelo teste de Scott-Knott (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6), provavelmente devido à baixa quantidade de solo que foi adicionado, e consequentemente baixa quantidade da enzima, com isso, a menor concentração do NBPT foi suficiente reduzir hidrólise da ureia. Os tratamentos com ureia tratada com 0,08 % de NBPT tiveram atividade enzimática 61 % menor que o tratamento de ureia comum, após 2 horas de incubação, esse tratamento chegou a obter atividade da urease 72 % menor que o controle, após 36 horas (Tabela 3).

Keerthisinghe & Blakeley (1995) relatam que 82 % da ureia do tratamento controle hidrolisou após 30 minutos de incubação, contra 34 % da ureia hidrolisada quando aplicada com 100 µM de NBPT. Ao utilizar 10 minutos de incubação, 50 µM de NBPT inibiu em 22 % a hidrólise da ureia. Os autores atribuem essa inibição à presença de NBPTO como impureza presente no NBPT adicionado à ureia, uma vez que os períodos de incubação foram baixos para que houvesse conversão do NBPT à NBPTO.

Tabela 3 – Atividade relativa da urease, sendo o resultado da ureia convencional dado como 100 %. Letras diferentes dentro das colunas indicam diferenças pelo teste Scott-Knott a 5 %.

Fertilizante	Médias				
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	36 horas
Ureia	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Ureia + NBPT 0,02%	71 b	79 b	71 b	50 b	40 c
Ureia + NBPT 0,03%	68 b	77 b	68 b	50 b	31 c
Ureia + NBPT 0,04%	65 b	77 b	66 b	46 b	31 c
Ureia + NBPT 0,06%	58 b	73 b	61 b	41 b	28 c
Ureia + NBPT 0,08 %	39 b	69 b	59 b	40 b	28 c
Ureia + ác húmico 5%	113 a	94 a	85 a	99 a	93 b
Ureia + ác húmico 10%	106 a	115 a	107 a	93 a	86 b
Ureia + ác húmico 20%	103 a	113 a	105 a	94 a	88 b
Ureia + zeólita 5%	81 b	94 a	112 a	87 a	91 b
Ureia + zeólita 10%	74 b	96 a	105 a	82 a	107 a

Ureia + zeólita 20%	68 b	121 a	102 a	106 a	111 a
Ureia + ácido húmico 5% + zeólita 15%	81 b	96 a	93 a	96 a	102 a
Ureia + ácido húmico 15% + zeólita 5%	97 a	113 a	88 a	90 a	107 a
Ureia + ácido húmico 10% + zeólita 10%	74 b	106 a	95 a	99 a	101 a

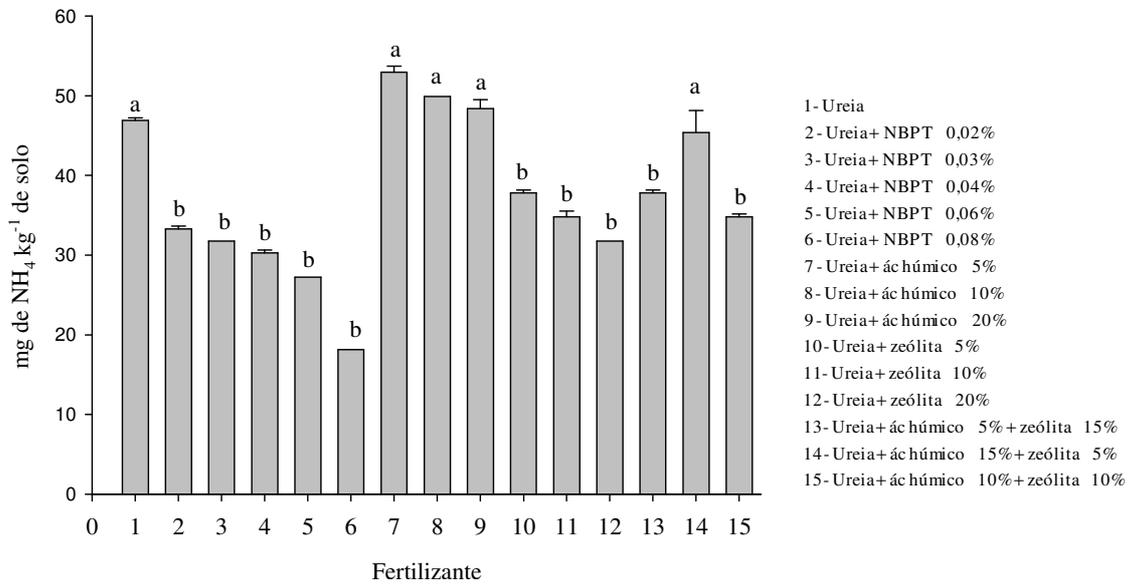


Figura 2 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 2 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

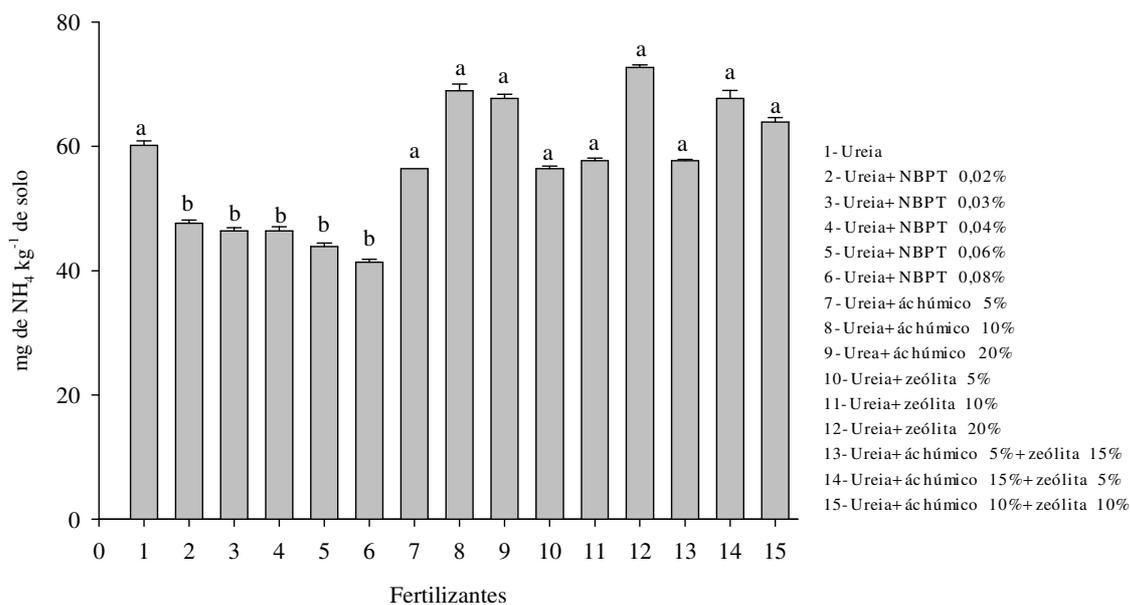


Figura 3 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 4 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

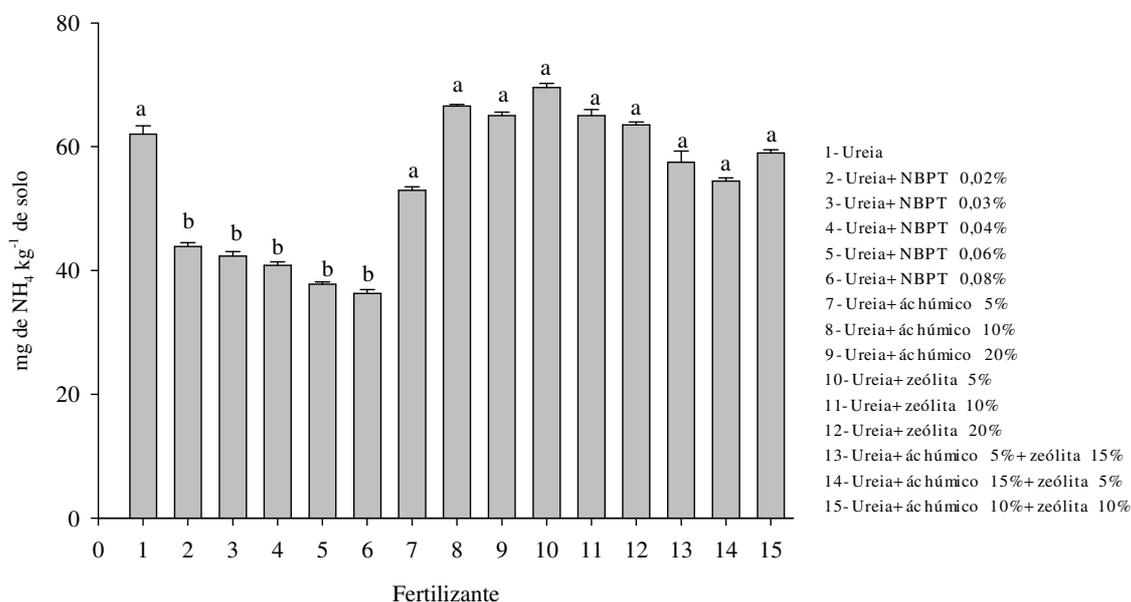


Figura 4 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 6 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

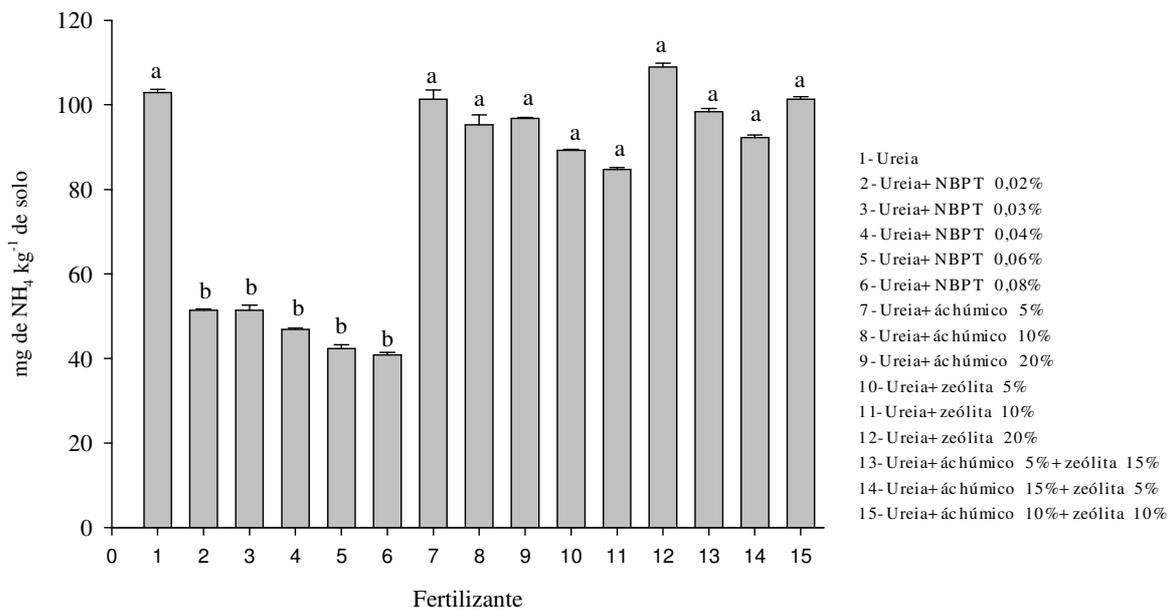


Figura 5 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 24 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

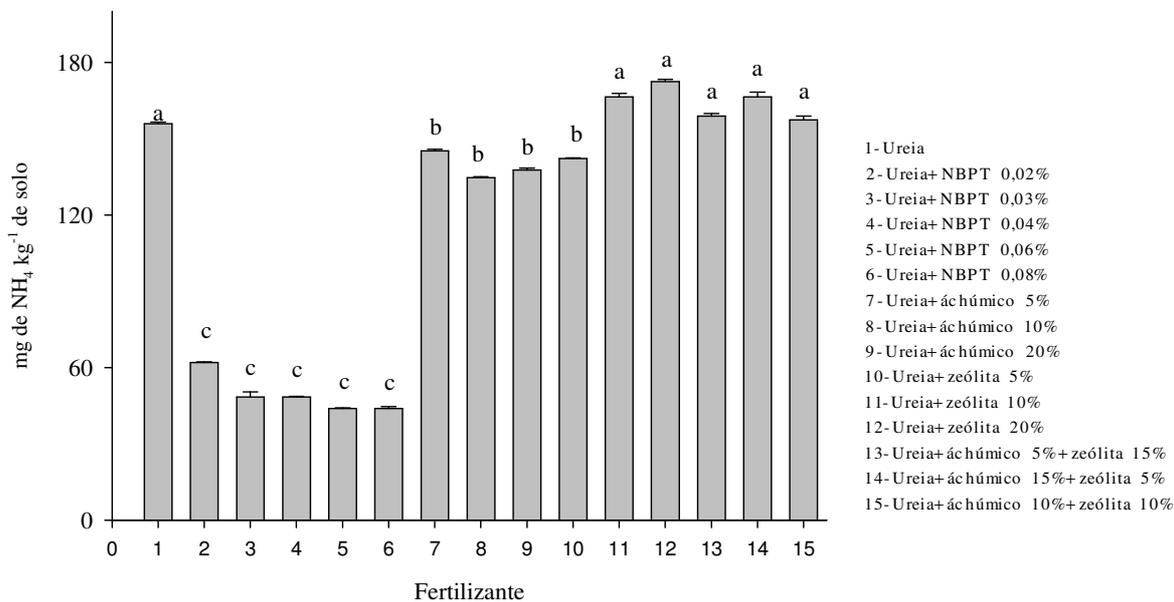


Figura 6 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 36 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott a 5 %.

4.1.2 Ácido húmico

Ao se estudar o efeito da urease no nitrogênio do solo deve-se proceder a incubação das amostras de terra sem a alteração do pH da solução reagente, ou seja, sem o uso de soluções tamponantes (Longo & Melo, 2005), para que os resultados sejam os mais próximos da realidade do solo estudado. A adição de ácido húmico à ureia reduziu o pH das soluções de reação (Tabela 4), onde os valores passaram de 5,54 para a ureia convencional chegando a 4,57 para a ureia aditivada com 20 % de ácido húmico.

Os resultados apresentados (Tabela 3) mostram que a atividade enzimática dos tratamentos de ureia aditivada com ácidos húmicos seguiram uma tendência decrescente após 6 horas de reação e após 36 horas os tratamentos com ácido húmico apresentaram diferença estatística em relação ao tratamento controle, com redução de até 14 % da atividade enzimática para o tratamento com 10 % de ácido húmico, porém as diferentes concentrações do ácido húmico não diferiram entre si. Provavelmente o efeito dos ácidos húmicos na atividade enzimática se deve à redução do pH da solução de reação. Longo & Melo (2005) observaram que a atividade enzimática se manteve 42 a 44 % abaixo da atividade máxima da enzima em pH 5,2 sendo a atividade máxima registrada em pH 8.

Tabela 4 – Valores de pH para as soluções incubadas como descrito por May & Douglas (1976), antes e após os períodos de reação.

Fertilizante	pH					
	inicial	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	36 horas
Ureia	5,54	5,56	5,90	6,09	8,05	8,38
Ureia + NBPT 0,02 %	5,38	5,50	5,62	5,96	7,30	7,68
Ureia + NBPT 0,03 %	5,23	5,34	5,47	5,79	7,17	7,39
Ureia + NBPT 0,04 %	5,08	5,14	5,43	5,67	6,84	7,14
Ureia + NBPT 0,06 %	5,01	5,04	5,40	5,54	6,75	7,02
Ureia + NBPT 0,08 %	4,98	5,05	5,34	5,45	6,58	6,85
Ureia + ác húmico 5 %	4,90	4,92	5,32	5,52	7,98	8,35
Ureia + ác húmico 10 %	4,76	4,80	5,33	5,57	8,04	8,34
Ureia + ác húmico 20 %	4,57	4,48	5,17	5,40	8,00	8,30
Ureia + zeólita 5 %	5,05	4,93	5,59	5,82	8,11	8,38
Ureia + zeólita 10 %	5,05	5,01	5,61	5,89	8,20	8,44
Ureia + zeólita 20 %	5,11	5,11	5,68	5,95	8,22	8,51
Ureia + ác húmico 5 % + zeólita 15 %	4,91	4,96	5,54	5,84	8,21	8,47
Ureia + ác húmico 15 % + zeólita 5 %	4,62	4,67	5,33	5,58	8,14	8,44
Ureia + ác húmico 10 % + zeólita 10 %	4,78	4,77	5,44	5,71	8,19	8,45

O pH inicial das soluções de reação sofreu acréscimo à medida que os períodos de incubação aumentavam, uma vez que a produção de amônia através da hidrólise da ureia consome prótons (Cantarella, 2007b). As soluções que apresentavam os menores valores

iniciais de pH foram as que apresentaram os maiores acréscimos e, após 36 horas incubadas, apenas os tratamentos de ureia tratada com NBPT, utilizados como substrato, apresentavam pH abaixo de 8.

4.1.3 Zeólita

Os tratamentos de ureia aditivada com zeólita e os tratamentos com mistura de zeólita e ácido húmico (ácido húmico 5 % zeólita 15 %; ácido húmico 10 % zeólita 10 %) diferiram do controle (ureia convencional) no período de duas horas de incubação (Figura 3). Também houve diferença entre o tratamento de ureia com 5 % de zeólita e o controle, após 36 horas. Esses resultados provavelmente são reflexo do baixo tempo de extração do amônio com a solução de KCl, onde parte do $N-NH_4^+$ pode ter permanecido adsorvido ao mineral.

A inibição enzimática competitiva por um composto é devido à semelhança na sua estrutura química com o substrato enzimático, o que lhe possibilita interação com o centro ativo da enzima (Paiva, 2009). As zeólitas não apresentam semelhança estrutural com a ureia e, portanto não se espera que exerçam competição pelo sítio ativo da enzima.

4.1.4 Análise da atividade enzimática ao longo do tempo

Analisando os modelos ajustados para o acúmulo do amônio ao longo do tempo (Tabela 5), nota-se que todos os tratamentos obtiveram acúmulos crescentes de NH_4^+ porém, ao dividir os valores de amônio pelos períodos de incubação, observa-se que a atividade da enzima reduziu ao longo do tempo. O comportamento da enzima ao longo do tempo varia em função do tipo de solo utilizado, Longo & Melo (2005) ao incubar um Latossolo Vermelho Aluminoférrico típico, observaram perda de 30 % na velocidade de hidrólise da ureia após oito horas de incubação, em comparação com o período de atividade máxima obtido com uma hora, porém ao incubar um Latossolo Vermelho distrófico típico a queda na velocidade foi mais acentuada nas três primeiras horas estabilizando-se após quatro horas de incubação.

Nota-se na Tabela 5 que os coeficientes angulares foram menores para os tratamentos com ureia aditivada com NBPT, determinando curvas com inclinações menores, refletindo em um comportamento mais constante, conseqüentemente com menores reduções na velocidade da hidrólise da ureia, evidenciando a ação contínua do composto ao longo do tempo, retardando a hidrólise da ureia e favorecendo a absorção do N pela planta. Nota-se que os coeficientes lineares também são menores para os tratamentos com as diferentes concentrações do NBPT, o que pode evidenciar a rápida ação do composto.

Tabela 5 - Modelos de regressão e coeficientes de determinação ajustados.

Tratamentos	Equações	R ²
Ureia	$\hat{Y} = 44,05 + 2,80^{***} x$	0,9820
Ureia + NBPT 0,02 %	$\hat{Y} = 38,65 + 0,66 * x$	0,7876
Ureia + NBPT 0,03 %	$\hat{Y} = 24,00 + 2,80 * x$	0,7495
Ureia + NBPT 0,04%	$\hat{Y} = 34,98 + 1,03 x - 0,02 x^2$	0,5173
Ureia + NBPT 0,06 %	$\hat{Y} = 32,58 + 0,91 x - 0,02 x^2$	0,4017
Ureia + NBPT 0,08%	$\hat{Y} = 26,09 + 1,40 x - 0,03 x^2$	0,4488
Ureia + ác. húmico 5 %	$\hat{Y} = 44,19 + 2,42 * x$	0,8736
Ureia + ác. húmico 10 %	$\hat{Y} = 54,29 + 1,91 * x$	0,8140
Ureia + ác. húmico 20 %	$\hat{Y} = 49,07 + 2,45 ** x$	0,9512
Ureia + zeólita 5 %	$\hat{Y} = 41,74 + 2,48 * x$	0,8763
Ureia + zeólita 10 %	$\hat{Y} = 39,41 + 3,07 * x$	0,8521
Ureia + zeólita 20 %	$\hat{Y} = 40,48 + 3,58 ** x$	0,9475
Ureia + ác. húmico 5 % + zeólita 15 %	$\hat{Y} = 36,41 + 3,17 ** x$	0,9601
Ureia + ác. húmico 15 % + zeólita 5 %	$\hat{Y} = 40,72 + 3,09 * x$	0,8989
Ureia + ác. húmico 10 % + zeólita 10%	$\hat{Y} = 38,37 + 3,12 ** x$	0,9499

4.2 Resultados obtidos por meio do método de Witte & Medina-Escobar (2001)

4.2.1 NBPT

Os resultados dos tratamentos de ureia com adição de NBPT obtidos por meio dessa metodologia foram concordantes com os resultados obtidos pelo método de May & Douglas (1976), mostrando a eficiência desse composto em inibir a atividade enzimática da urease. Porém algumas singularidades foram observadas, nota-se que após 36 horas de incubação a eficiência do inibidor reduziu consideravelmente (Tabela 6). Tais diferenças entre os métodos eram esperadas, visto que as soluções de reação foram incubadas em condições diferentes de temperatura, concentração do substrato e fonte enzimática. Nesse caso, a maior contribuição para a redução da eficiência do inibidor, possivelmente foi devido à temperatura de incubação, que foi maior que a utilizada no primeiro método. Condições adversas, como temperaturas elevadas, alta concentração da enzima e pH alcalino favorecem a atividade enzimática sendo necessárias doses mais elevadas do inibidor para manter a hidrólise da ureia em baixa velocidade (Bremner & Chai, 1986; Schlegel et al. 1986; Carmona et al. 1990; Watson et al. 1994). Devido a isso, a inibição máxima observada ocorreu no menor período de incubação (duas horas), sendo que a atividade enzimática no tratamento com ureia tratada com 0,08 % de NBPT foi 81 % menor que a atividade da enzima no tratamento com ureia comum (Tabela 6). Após 36 horas de incubação a ureia tratada com a concentração mais

baixa do NBPT (0,02 %) já se igualava à ureia comum, mostrando a redução da eficiência do inibidor com o aumento do tempo de incubação.

Não houve diferença entre as concentrações do inibidor, para os períodos de incubação de 2, 4, 6 e 24 horas (Figuras 7, 8, 9, 10 e 11), concordando com os resultados obtidos por meio do método de May & Douglas (1976).

Tabela 6 – Atividade relativa da urease, sendo o resultado da ureia convencional dado como 100 %. Letras diferentes dentro das colunas indicam diferenças pelo teste Scott-Knott a 5 %.

Fertilizante	Médias Relativas				
	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	36 horas
Ureia	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Ureia + NBPT 0,02 %	59 b	68 b	43 b	55 b	90 a
Ureia + NBPT 0,03 %	38 b	51 b	41 b	58 b	76 b
Ureia + NBPT 0,04 %	31 b	54 b	35 b	54 b	77 b
Ureia + NBPT 0,06 %	32 b	69 b	38 b	51 b	78 b
Ureia + NBPT 0,08 %	19 b	48 b	37 b	58 b	78 b
Ureia + ác húmico 5 %	101 a	107 a	94 a	91 a	99 a
Ureia + ác húmico 10 %	115 a	100 a	96 a	94 a	93 a
Ureia + ác húmico 20 %	113 a	95 a	91 a	93 a	113 a

4.2.2 Ácido húmico

A adição de ácido húmico à ureia reduziu o pH das soluções fertilizantes, sendo que a maior redução foi nos tratamentos com maior concentração do ácido. Na Tabela 7, nota-se que houve acréscimo no pH das soluções que foram incubadas, devido à ação da enzima, confirmando os resultados obtidos através da metodologia de May & Douglas (1976).

Apesar de reduzir o pH das soluções, a atividade enzimática dos tratamentos de ureia aditivada com ácido húmico não diferiu do controle, possivelmente devido à temperatura de incubação e, ou, da fonte enzimática, visto que a enzima purificada foi adicionada às soluções, podendo estar em concentração acima das normalmente encontradas no solo.

A constante de equilíbrio entre as formas aquosas NH_4^+ e NH_3 evidencia que em solução aquosa a pH 7 e a 25 °C o equilíbrio entre o amônio e a amônia é deslocado no sentido do NH_4^+ , que prevalecerá na solução em detrimento à amônia (Cantarella, 2007).

Neste caso, mesmo que não atuem reduzindo a atividade da enzima urease, os ácidos húmicos reduzem a volatilização da amônia ao manter o íon amônio em solução.

Tabela 7 - Valores de pH para as soluções incubadas como descrito por Witte & Medina-Escobar (2001), antes e após os períodos de reação.

Fertilizante	pH					
	inicial	2 horas	4 horas	6 horas	24 horas	36 horas
Ureia	8,37	8,27	8,44	8,38	8,10	8,50
Ureia + NBPT 0,02 %	8,29	8,12	8,01	8,18	8,13	8,37
Ureia + NBPT 0,03 %	7,75	7,65	6,32	7,87	7,95	8,12
Ureia + NBPT 0,04 %	7,39	7,59	5,25	7,75	7,94	8,13
Ureia + NBPT 0,06 %	7,17	7,54	6,12	7,66	7,93	8,12
Ureia + NBPT 0,08 %	7,03	7,46	6,65	7,34	7,80	7,90
Ureia + ác húmico 5%	4,87	6,50	7,20	6,93	7,58	7,78
Ureia + ác húmico 10 %	4,00	5,58	6,95	6,22	7,48	7,75
Ureia + ác húmico 20 %	3,68	3,98	3,97	4,08	4,35	4,87

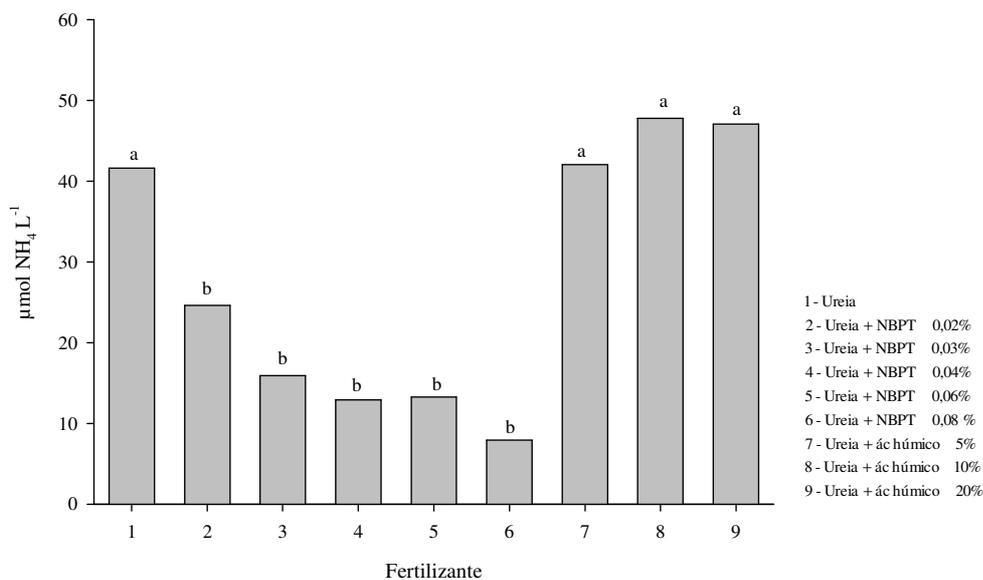


Figura 7 - Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 2 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.

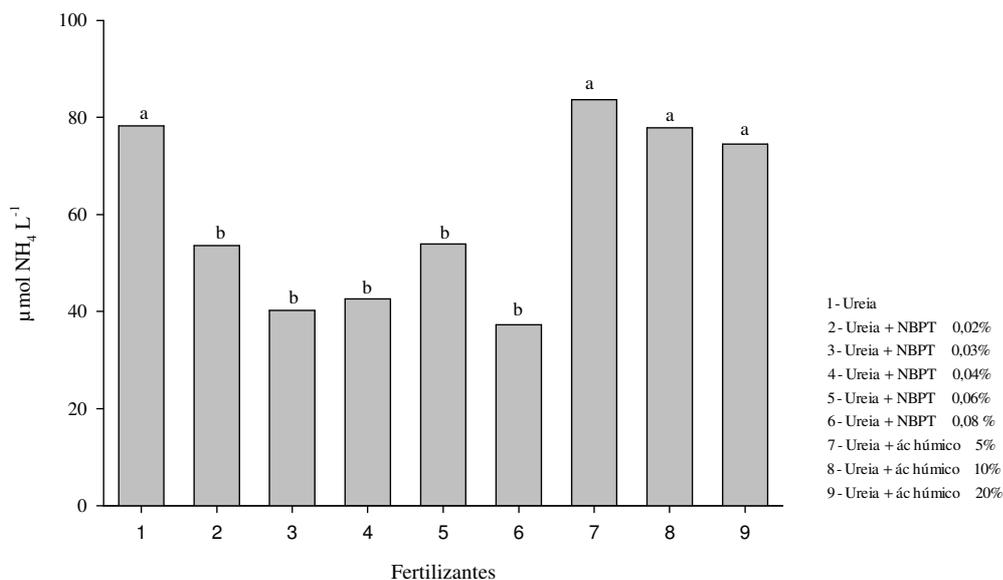


Figura 8 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 4 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.

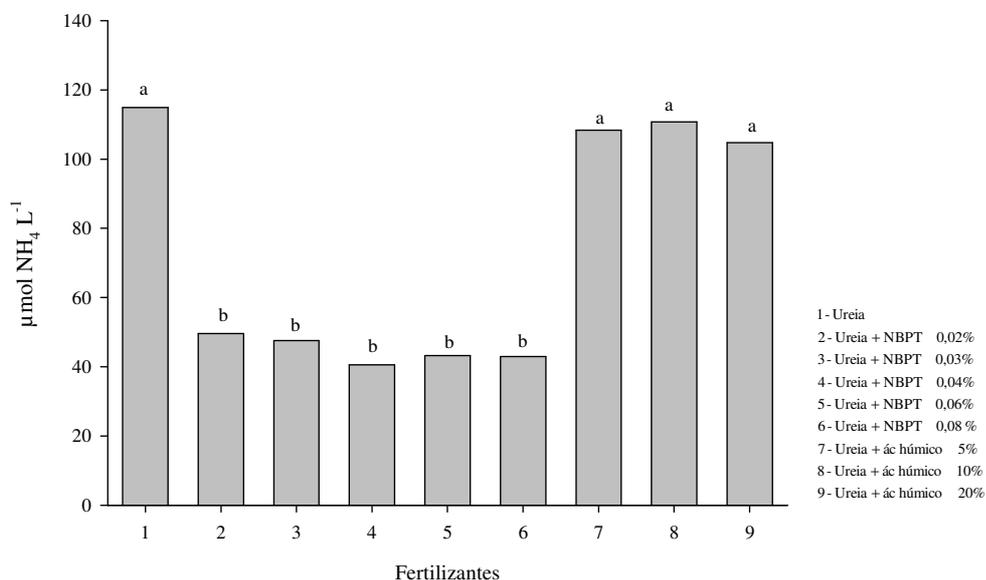


Figura 9 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 6 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.

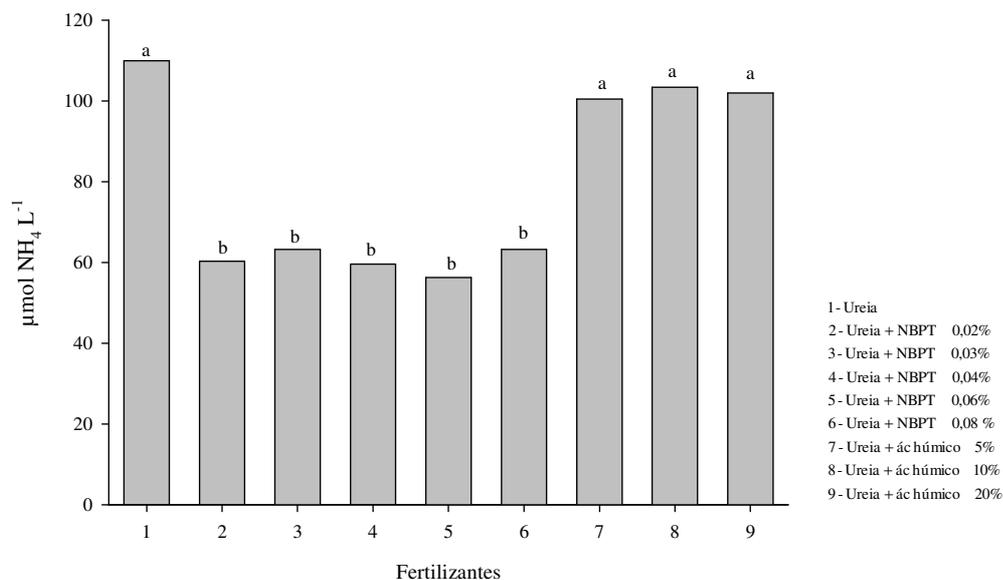


Figura 10 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 24 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.

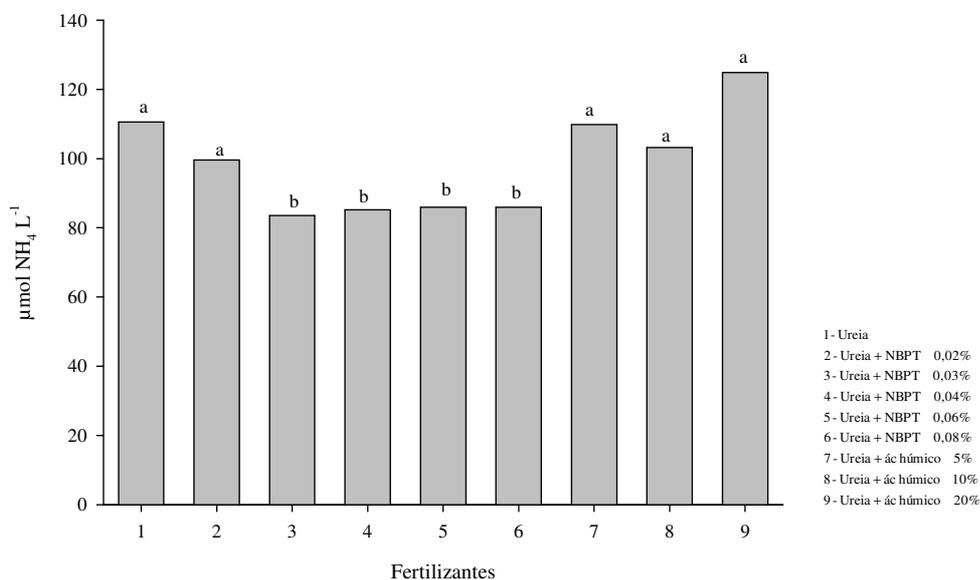


Figura 11 – Produção de amônio, devido à hidrólise da ureia convencional e aditivada, submetida a 36 horas de incubação. Letras diferentes entre as colunas indicam diferença pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 %.

4.2.3 Análise da atividade enzimática ao longo do tempo

Em todos os tratamentos os acúmulos de amônia foram crescentes ao longo do tempo, porém a velocidade da hidrólise da ureia foi máxima no menor período de incubação, fato que pode ser observado ao dividir a quantidade de amônia nas soluções pelos respectivos períodos de incubação. Os tratamentos de ureia tratada com NBPT resultaram em modelos lineares para a atividade da urease.

Tabela 8 - Modelos e coeficientes de determinação ajustados.

Tratamentos	Equações	R ²
Ureia	$\hat{Y} = -13,40 + 29,90 * x - 1,62 x^2 + 0,0247 x^3$	0,9952
Ureia + NBPT 0,02 %	$\hat{Y} = 34,09 + 1,63 * x$	0,8033
Ureia + NBPT 0,03 %	$\hat{Y} = 27,56 + 1,57 * x$	0,8534
Ureia + NBPT 0,04%	$\hat{Y} = 24,46 + 1,65 x *$	0,8541
Ureia + NBPT 0,06 %	$\hat{Y} = 29,41 + 1,47 x$	0,7003
Ureia + NBPT 0,08%	$\hat{Y} = 21,34 + 1,81 * x$	0,8586
Ureia + Ác. Húmico 5 %	$\hat{Y} = -6,66 + 27,85 * x - 1,55 x^2 * + 0,024 * x^3$	0,9975
Ureia + Ác. Húmico 10 %	$\hat{Y} = 0,124 + 25,70 x - 1,40 x^2 + 0,021 x^3$	0,9911
Ureia + Ác. Húmico 20 %	$\hat{Y} = 3,11 + 2373 x - 1,32 x^2 + 0,021 x^3$	0,9941

5 CONCLUSÕES

Os dois métodos de análise utilizados confirmaram a eficiência do NBPT em inibir a ação enzimática.

Após duas horas de incubação, o NBPT a 0,02 % (m/m) foi suficiente para inibir a ação hidrolítica da enzima urease, pelos dois métodos testados.

Dentre os inibidores testados, o NBPT foi o mais eficiente em retardar a hidrólise da ureia.

A adição de ácido húmico reduziu a atividade da urease, após 36 horas de reação, pelo método proposto por May & Douglas (1976).

A zeólita não influenciou na atividade da enzima urease, pelo método May & Douglas (1976).

Não foi possível avaliar o efeito da zeólita na atividade da enzima urease por meio do método de Witte & Medina-Escobar (2001).

A escolha do método de análise da atividade da enzima urease dependerá do tipo e dos objetivos do estudo.

6 BIBLIOGRAFIA

- ALVES, A. C.; ALVES, T. C.; MACEDO, F. B.; BERNARDI, A. C. C.; OLIVEIRA, P. P. A.; ROCHETTI, R. C. Adição de zeólita para redução da volatilização de amônia em solo fertilizado com ureia. EMBRAPA Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 2007. ISSN 1981-2086.
- ANDREWS, R. K.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Urea and urease. *Adv inorg Biochem* 1984; 6; 245 – 83.
- BARTZ, J. K.; JONES, R. L. Availability of nitrogen to sudangrass from ammonium-saturated clinoptilolite. *Soil Science Society of America Journal*, v. 47, p. 259 – 262, 1983.
- BAUTISTA, J.M.; KIM, H.; AHN, D.-H.; ZHANG, R.; OH, Y.-S. Changes in physicochemical properties and gaseous emissions of composting swine manure amended with alum and zeolite. *Korean Journal of Chemical Engineering*, v.28, p.189 -194, 2011. DOI: 10.1007/s11814-010-0312-6.
- BERNAL, M.P.; LOPEZ-REAL, J.M.; SCOTT, K.M. Application of natural zeolites for the reduction of ammonia emissions during the composting of organic wastes in a laboratory composting simulator. *Bioresource Technology*, v.43, p.35-39, 1993. DOI: 10.1016/0960-8524(93)90079-Q.
- BERNARDI, A. C. C.; PAIVA, P. R. P.; MONTE, M. B. M. Produção de matéria seca e teores de nitrogênio em milho para silagem adubado com ureia misturada a zeólita. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, 2007. 1981-206x.
- BERNARDI, A.C.C.; MONTE, M.B.M.; PAIVA, P.R.P. Produção de matéria seca, extração e utilização de nitrogênio em aveia adubada com ureia misturada com zeólita. *Revista Agricultura*, v.8, p.1-10, 2010.
- BOUZO, L.; LOPEZ, M.; VILLEGAS, R.; GARCIA, E.; ACOSTA, J. A. Use of natural zeolites to increase yields in sugarcane crop minimizing environmental pollution. In: *World Congress of Soil Science*, 15., July 1994, Acapulco Mexico. *Transactions... Acapulco: International Society of Soil Science*, 1994. V. 5a, p. 695 – 701.
- BREMNER, J. M. & AHMAD, N. Recent research on problems in the use of urea as a nitrogen fertilizer. *Nitrogen Economy in Tropical Soils*, 42:321-329, 1995.
- BREMNER, J. M.; CHAI, H. S. Evaluation of N-butyl phosphorothioic triamide for retardation of urea hydrolysis in soil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v.17, n.3, p.337-351, 1986.
- BREMNER, J.M. & KEENEY, D.R. Steam distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. *Anal. Chim. Acta*, 32:485-495, 1965.

- CANTARELLA, H.; MARCELINO, R. Uso de inibidor de urease para aumentar a eficiência da ureia. In: SIMPÓSIO SOBRE INFORMAÇÕES RECENTES PARA OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA, 2007, Piracicaba. Anais... Piracicaba: IAC, 2007a. 1 CD-ROM. 19p.
- CANTARELLA, H. Nitrogênio. In: NOVAIS, R. F. et al. (Ed.). Fertilidade do solo. Viçosa: SBCS, 2007b. p.375-470.
- CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P. C. O.; CONTIN, T. L. M.; DIAS, F. L. F.; ROSSETTO, R.; MARCELINO, R.; COIMBRA, R. B.; QUAGGIO, J. A. Ammonia volatilisation from urease inhibitor-treated urea applied to sugarcane trash blankets. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.65, n.4, p.397-401, 2008.
- CARMONA, G.; CHRISTIANSON, C. B.; BYRNES, B. H. Temperature and low concentration effects of the urease inhibitor N-(n-butyl)thiophosphoric triamide (nBTPT) on ammonia volatilization from urea. *Soil Biology and Biochemistry*, v.22, n.7, p.933-937, 1990.
- CARRION, M.; GONZALEZ, R.; GIL, R.; RODRIGUEZ, C.; MARTINEZ-VIERA, R.; CRUZ, A.; COLOMBO, R.; PENA, E.; TORRES, S. Influence of fertilizers with zeolite on crop yields. In: Instituto de Investigaciones Fundamentales en agricultura Tropical Alejandro de Humbolt. 90 Anos de La Estacion Experimental Agronomica de Santiago de Las Vegas. Santiago de las Vegas: Estacion Experimental agronômica, 1994. P. 201 – 211.
- CHRISTIANSON, C. B.; BYRNES, B. H.; CARMONA, G. A comparison of the sulfur and oxygen analogs of phosphoric triamide urease inhibitors in reducing urea hydrolysis and ammonia volatilization. *Fertilizer Research*, v.26, n.1-3, p.21-27, 1990.
- COSTA, M. C. G.; VITTI, G. C.; CANTARELLA, H. N-NH₃ losses from nitrogen sources applied over unburned sugarcane straw. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.27, n.4, p.631-637, 2003.
- CRESPO, G. Effect of zeolite on the efficiency of the N applied to *Brachiaria decumbens* in a red ferrallitic soil. *Cuban Journal of Agricultural Science*, v. 23, p. 207 – 212, 1989.
- DE PAIVA, DIOGO MENDES. Redução na volatilização de amônia derivada da ureia por ácidos húmicos produzidos de carvão de eucalipto. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- EMBRAPA SOLOS (Rio de Janeiro, RJ). Manual e métodos de análise de solo. Rio de Janeiro, 1997.
- FERGUSON G.; PEPPER, I. Ammonium retention in soils amended with clinoptilolite. *Soil Science Society of America Journal*, v. 51, p. 231 – 234, 1987.
- FERREIRA, FLÁVIA ALVES. Estudos da modificação da resina não-iônica Amberlite XAD-7 com monoetanolamina (MEA) para retenção de espécies de S (IV). 2007. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

- FLANIGEN, E.M. 1981. Crystal structure and chemistry of natural zeolites. *In*: F.A. MUMPTON (ed.). *Reviews in Mineralogy*, 4: 165-175.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, Current world fertilizer trends and outlook to 2018, Rome, 2015. <http://www.fao.org/3/a-i4324e.pdf>.
- GIACOMINI, D. A.; AITA, C.; PUJOL, S. B.; GIACOMINI, S. J.; DONEDA, A.; CANTÚ, R. R.; DESSBESELL, A.; LUDTKE, R., C.; SILVEIRA, C. A. P. Mitigação das emissões de amônia por zeólitas naturais durante a compostagem de dejetos de suínos. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v.49, n.7, p.521-530, jul. 2014.
- GUIMARÃES, GELTON GERALDO FERNANDES. Substâncias húmicas como aditivos para o controle da volatilização de amônia proveniente da ureia. 2011. 39f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- HARFMANN, R. G. & CROUCH, S. R. Kinetic study of Berthelot reaction steps in the absence and presence of coupling reagents. *Talanta*, v. 36, n. 1-2, p. 261 – 269, 1989.
- HAYES, M. H. B. & WILSON, W.R., 1997. *Humic Substances, Peats and Sludges*. Royal Society of Chemistry, Cambridge.
- KEERTHISINGHE, D. G. & BLAKELEY, R. L. Inhibition of jack bean urease by phosphoric an thiophosphoric triamides. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 27, No. 6, pp. 739-742, 1995.
- KEERTHISINGHE, D. G. & FRENEY, J. R. Inhibition of urease activity in flooded soils: Effect of thiophosphoric triamides and phosphoric triamides. *Soil Biol, Biochem.* Vol. 26. No. 1 I, pp. 1527-1533, 1994.
- LANNA, A. C.; SILVEIRA, P. M.; SILVA, M. B.; FERRARESI, T. M.; KLIEMANN, H. J. Urease activity as influenced by planting system and plant cover in soil under common bean. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.34, n.6, p.1933-1939, 2010.
- LARA CABEZAS, W. A. R.; KORNDORFER, G. H.; MOTTA, S. A. Volatilização de N-NH₃ na cultura de milho: I. Efeito da irrigação e substituição parcial da ureia por sulfato de amônio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.21, n.3, p.481-487, 1997.
- MANUNZA, B.; DEYANA, S.; PINTORE, M.; GESSA, C. The binding mechanism of urea, hydroxamic acid and N-(n-butyl)-phosphoric triamide to the urease active site. A comparative molecular dynamics study. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 31, p. 789 – 796, 1999.
- MAY, P.B. & DOUGLAS, L.A. Assay for soil urease activity. *Plant Soil*, 45:301-305, 1976.
- MING, D.W.; MUMPTON, F.A. Zeolites in soils. *In*: DIXON, J.B.; WEED, S.B. (Ed.). *Minerals in soil environments*. 2nd ed. Madison: Soil Science Society of America, 1989. p.873-911.

- MONTE, M. B. M. & RESENDE, N.G.A.M. Zeolitas Naturais. In: Lins, F.F.; Luz, A. B. Rochas e Minerais Industriais. Cetem. P. 699 - 720. 2005.
- OKUMURA, R. S. & MARIANO, D.C. Aspectos agronômicos da ureia tratada com inibidor de urease. *Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais*, Guarapuava (PR), v.8, n.2, p. 403 – 414, 2012.
- PALUCCI, J. A. Biomassa microbiana e atividade enzimática em um solo degradado pela exploração de cassiterita adubado com compostos de diferentes granulometrias. 2004. 113f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista, UNESP, Jaboticabal, 2004.
- PRO, D.; HUGUET, S.; ARKOUN, M.; NUGIER-CHAUVIN, C.; GARCIA-MINA, J. M.; OURRY, A.; WOLBERT, D.; YVIN, J. C.; FERRIÈRES, V. From algal polysaccharides to cyclodextrins to stabilize a urease inhibitor. *Carbohydrate Polymers*. 112 (2014) 145-151.
- PASSAGLIA, E. & SHEPPARD, R.A. 2001. The crystal of zeolites. In: D.L. BISH; D.W. MING, (ed.). *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*,45: 69-116.
- PHONGPAN, S.; FRENEY, J. R.; KEERTHISINGHE, D. G.; CHAIWANAKUPT, P. Use of phenylphosphorodiamidate and N-(n-butyl) thiophosphorictriamide to reduce ammonia loss and increase grain yield following application of urea to flooded rice. *Fertilizer Research* 41: 59-66, 1995.
- RAWLUK, C. D. L.; GRANT, C. A.; RACZ, G. J. Ammonia volatilization from soils fertilized with urea and varying rates of urease inhibitor NBPT. *Canadian Journal of Soil Science*, v.81, p.239–246, 2001.
- REHÁKOVÁ, M.; CUVANOVÁ, S.; DZIVÁK, M.; RIMÁR, J.; GAVAL'OVÁ, Z. Agricultural and agrochemical uses of natural zeolite of the clinoptilolite type. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v.8, p.397-404, 2004.
- REYNOLDS, C.M. & WOLF, D.C. Effects of soil moisture and air relative humidity on ammonia volatilization from surfaces-applied urea. *Soil Sci.*, 143:144-152, 1987.
- ROSA, A.H.; ROCHA, J.C.; FURLAN, M. Substâncias húmicas de turfa: estudo dos parâmetros que influenciam no processo de extração alcalina. *QUÍMICA NOVA*, 23(4), 2000.
- SANGOI, L.; ERNANI, P. R.; LECH, V. A.; RAMPAZZO, C. Volatilization of N-NH₃ influenced by urea application forms, residue management and soil type in lab conditions. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.33, n.4, p.687-692, 2003.
- SCHLEGEL, A. J.; NELSON, D. W.; SOMMERS, L. E. Field evaluation of urease inhibitors for corn production. *Agronomy Journal*, v. 78, p. 1007-1012, 1986.

- SCIVITTARO, W. B.; GONÇALVES, D. R. N.; VALE, M. L. C.; RICORDI, V. G. Nitrogen losses by ammonia volatilization and lowland rice response to NBPT urease inhibitor-treated urea. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.40, n.6, p.1283-1289, 2010.
- SEARLE, P. L. The Berthelot or indophenol reaction and its use in the analytical chemistry of nitrogen. *Analyst*, v. 109, p. 549 – 568, 1984.
- SHINZATO, M.C. Remoção de metais pesados em solução por zeólitas naturais: revisão crítica. *Revista do Instituto Geológico. São Paulo*, 27-28 (1/2), 65-78, 2007.
- SILVA, I.R. & MENDONÇA, E.S. Matéria orgânica do solo. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B. & NEVES, J.C.L. Fertilidade do solo. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p.275-374.
- SOARES, F. S. C. Caracterização e aplicação de zeólitas naturais. 2010. 228 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo.
- SOARES, J. R.; CANTARELLA, H.; MENEGALE, M. L. C. Ammonia volatilization losses from surface-applied urea with urease and nitrification inhibitors. *Soil Biology & Biochemistry* 52 (2012) 82-89.
- SOARES, Johnny Rodrigues. Efeito da inibição de urease e de nitrificação na volatilização de NH₃ pela aplicação superficial de ureia no solo. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Agrônomo de Campinas. Campinas.
- SOUSA, R. A.; SILVA, T. R. B. Typic Hapludox acidification with the application of nitrogen arising from urea, ammonium sulfate and sulfammo. *Cultivando o Saber*, Cascavel, v.2, n.3, p.78-83, 2009.
- STAFANATO, J.B. Aplicação de misturas granuladas NK e NS em cultivar de arroz (*Oriza Sativa*). 2009. 67p. Dissertação (Pós Graduação em Agronomia – Ciência do Solo) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. RJ, 2009.
- UPADHYAY, L.S.B. Urease inhibitors: A review. *Indian Journal of Biotechnology*. Vol. 11, October 2012, p. 381-388.
- URQUIAGA, S; MALAVOLTA, E. Ureia: um adubo orgânico de potencial para a agricultura orgânica. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*, Brasília, v.19, n.2, p.333-339, 2002.
- WATSON, C.J.; MILLER, H.; POLAND, P.; KILPATRICK, D. J.; ALLEN, M. B. D.; GARRET, M. K.; CHRISTIANSON, C. B. Soil properties and the ability of the urease inhibitor N-(n-butyl)thiophosphoric triamide (nBTPT) to reduce ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Biology and Biochemistry*, v.26, n.9, p.1165-1171, 1994.
- WATSON, C. J. Urease activity and inhibition – Principles and practice. London: The International Fertilizer Society. Proceedings n.454, 2000. 40p.

- WATSON, C. J.; AKHONZADA, N. A.; HAMILTON, J. T. G.; MATTHEWS, D. I. Rate and mode of application of the urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ammonia volatilization from surface-applied urea. *Soil Use and Management*. 24, 246-253, 2008.
- WEIL, R. R. & Magdoff, F. Significance of soil organic matter to soil quality and health. In: Magdoff, F. & Weil, R. R. *Soil matter in sustainable agriculture*. CRC Press, 2004. P.1-44.
- WERNECK, C.G. Perdas por volatilização e eficiência agronômica da mistura de ureia com zeólita natural aplicada na cultura da roseira (*Rosa spp.*). 2008. 90p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ.
- WITTE, C. P. & MEDINA-ESCOBAR, N. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry*, 290: 102 – 107, 2001.
- ZHENGPING, W.; VAN CLEMPUT, O.; BAERT, L. Movement of urea and its hydrolysis products as influenced by moisture content and urease inhibitors. *Biology and Fertility of Soils*, v.22, n.1-2, p.101-108, 1996.
- YUSUFF, M.T.M.; AHMED, O.H.; AB MAJID, N.M. Effect of Mixing Urea with Humic Acid and Acid Sulphate Soil on Ammonia Loss, Exchangeable Ammonium and Available Nitrate. *American Journal of Environmental Sciences* 5 (5): 588-591, 2009.