

## SISTEMA AUTOMATIZADO PARA ANÁLISE DIRETA DE TECIDO VEGETAL POR ESPECTROSCOPIA MOLECULAR

BAUMANN, L.<sup>1</sup>; PESSEL, E. F.<sup>2</sup>; PAPPIS, C.<sup>1</sup>; FISCHBORN, L. A.<sup>2</sup>; LIBRELOTTO, M.<sup>1</sup>; SANTOS, R. O.<sup>3</sup>; SANTOS, R. B.<sup>3</sup>; HELFER, G. A.<sup>4,5</sup>; COSTA, A. B.<sup>3</sup>

**PALAVRAS-CHAVE:** Quimiometria. Espectroscopia. Tecido Vegetal.

### RESUMO

Com o aumento da demanda por métodos que seguem os princípios da química analítica verde e devido a necessidade de maior produtividade das áreas cultivadas, novas técnicas de análise em tecido vegetal têm sido estudadas. Ultimamente, o uso da espectroscopia molecular vem se destacando, principalmente por apresentar resposta rápida em diversos tipos de análises, além de apresentar gastos significativamente menores em relação a outros métodos convencionais de laboratório. Assim, o presente estudo tem o objetivo de avaliar o uso da espectroscopia no infravermelho próximo aliado a métodos quimiométricos, para análise de nitrogênio em tecido vegetal. Para tanto, espectros de infravermelho na faixa de 960-2.400 nm de diversas espécies, foram obtidos a partir de uma mesa auto-amostradora. O equipamento produz um espectro de varredura com área de superfície de 4 cm<sup>2</sup>, na região entre 450-2450 nm, com capacidade de 40 amostras e frequência analítica da ordem 6 amostras por minuto. Os modelos de calibração foram realizados utilizando o software SOLO+MIA (Eigenvector Research, Inc), 8.6.1, com diferentes técnicas de pré-tratamentos dos espectros. Os resultados de concentração de nitrogênio não diferiram estatisticamente ( $p = 0,987$ ) daqueles obtidos pelo método oficial, na faixa de 4,77 a 36,69 g kg<sup>-1</sup>. O modelo desenvolvido apresentou os seguintes erros, RMSEC 1,25 g kg<sup>-1</sup>; RMSECV 2,22 g kg<sup>-1</sup> e R<sup>2</sup> cal 0,986. Deste modo, observa-se que os resultados foram satisfatórios, legitimando que é possível o uso de espectroscopia NIR para estes tipos de análise.

### AUTOMATED SYSTEM FOR DIRECT ANALYSIS OF VEGETABLE TISSUE BY MOLECULAR SPECTROSCOPY

**KEYWORDS:** Chemometrics. Spectroscopy. Vegetable Tissue.

### ABSTRACT

With the growing demand for methods that follow the principles of green analytical chemistry and with the largest need for productivity in cultivated areas, new techniques for the analysis of nitrogen in plant tissue have been studied. Lately, the use of molecular spectroscopy has stood out, mainly because it presents a rapid response in several types of analysis, in addition to presenting significantly lower costs in relation to other conventional laboratory methods. Thus, the present study aims to evaluate the use of near infrared spectroscopy combined with chemometric methods, for the analysis of nitrogen in plant tissue. For this, infrared spectra in the 960-2400 nm range of several species, were obtained from a self-sampling table. The equipment produces a scanning spectrum with a surface area of 4 cm<sup>2</sup>, in the region between 450-2450 nm, with a capacity of 40 samples and an analytical frequency of the order of 6 samples per minute. The calibration models were performed using the SOLO + MIA software (Eigenvector Research, Inc), 8.6.1, with different pre-treatment techniques for the spectra. The results of nitrogen concentration did not differ statistically ( $p = 0.987$ ) from those obtained by the official method, in the range of 4.77 to 36.69 g kg<sup>-1</sup>. The developed model presented the following errors, RMSEC 1.25 g kg<sup>-1</sup>; RMSECV 2.22 g kg<sup>-1</sup> and R<sup>2</sup> cal 0.986. Thus, it is observed that the results were satisfactory, legitimizing that it is possible to use NIR spectroscopy for these types of analysis.

<sup>1</sup> Acadêmicas do Curso de Química na Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mails: [luiza.baumann@gmail.com](mailto:luiza.baumann@gmail.com), [cristianepappis@mx2.unisc.br](mailto:cristianepappis@mx2.unisc.br), [marciallibrelotto@mx2.unisc.br](mailto:marciallibrelotto@mx2.unisc.br).

<sup>2</sup> Acadêmica do Curso de Engenharia Química na Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mails: [eduardapessel@gmail.com](mailto:eduardapessel@gmail.com), [leticiafischborn@hotmail.com](mailto:leticiafischborn@hotmail.com)

<sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação em Sistemas e Processos Industriais da Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mails: [rosantos@unisc.br](mailto:rosantos@unisc.br), [rbastos@mx2.unisc.br](mailto:rbastos@mx2.unisc.br), [adilson@unisc.br](mailto:adilson@unisc.br)

<sup>4</sup> Departamento de Engenharias, Arquiteturas e Computação da Universidade de Santa Cruz do Sul. E-mail: [ghelfer@gmail.com](mailto:ghelfer@gmail.com)

<sup>5</sup> Programa de Pós-Graduação em Computação Aplicada, Universidade Vale do Rio dos Sinos. E-mail: [ghelfer@gmail.com](mailto:ghelfer@gmail.com)

## 1 INTRODUÇÃO

Com o crescente aumento da população e, conseqüentemente, maior demanda por insumos, há uma necessidade de adquirir maior eficiência da produtividade das áreas cultivadas. Atualmente, a análise de solos é o principal modo de determinação de fertilidade do solo, a partir da qual são prescritas as condições de manejo adequadas. Contudo, a análise foliar vem se destacando como uma alternativa para o monitoramento dos cultivares, nas diferentes etapas do seu desenvolvimento (RESENDE, 2014).

A análise foliar permite a identificação da quantidade de nitrogênio presente na planta, composto extremamente importante, pois é um macronutriente essencial para produção de clorofila e aminoácidos, que se agrupam para formação do DNA, RNA e proteínas (MCGRATH et al., 2014). Além disso, a nutrição da planta está diretamente relacionada com os nutrientes presentes no solo, assim, é possível definir qual o melhor procedimento a ser seguido para suprir as necessidades.

A análise clássica utilizada para determinação de nitrogênio total (NKT) é o método de Kjeldahl que compreende duas etapas: a digestão da amostra para conversão de nitrogênio orgânico a íon amônio e determinação do amônio no digerido, após a destilação com álcali (BREMNER, 1965; YASYHARA & NOKIHARA, 2001). Entretanto, essa é uma determinação demorada e que utiliza grande quantidade de reagente, resultando em um elevado volume de resíduos (MUÑOZ-HUERTA et al. 2013)

Entre as novas metodologias que vêm sendo desenvolvidas, é possível destacar o uso da espectroscopia no infravermelho. Essa técnica consiste na obtenção e interpretação dos espectros que caracterizam a amostra, obtendo resultados de forma rápida, com menos gastos que o método clássico e sem necessidade de reagentes químicos, sendo assim, uma tecnologia ambientalmente mais sustentável (FERREIRA, 2015; PASQUINI, 2018).

A espectroscopia no infravermelho descreve a interação da matéria com a radiação em uma faixa entre 660 nm e 4000 nm, onde, entre essa zona, são compreendidas as regiões NIR (do inglês *Near Infrared*), MIR (do inglês *Medium Infrared*) e FIR (do inglês *Far Infrared*). Os mais utilizados para análises são NIR e MIR que compreendem uma faixa de comprimento de onda entre 660 nm a 2500 nm e 2500 nm a 4000 nm, respectivamente, e permitem a identificação de um composto ou a composição de uma amostra. (FERREIRA, 2015; BARBOSA, 2007). Porém como os espectros gerados nesta técnica são, geralmente, sobretons e bandas de combinação das vibrações fundamentais entre ligações O-H, N-H e C-H é necessário associar espectroscopia a métodos quimiométricos de estatística multivariada para avaliação quantitativa e qualitativa de diferentes materiais (YANG & MOUAZEN, 2012).

A quimiometria permite que as medidas realizadas em métodos analíticos possam ser relacionadas com uma grande quantidade de dados e, com o auxílio de ferramentas matemáticas e estatísticas, fornecer informações acerca desses dados. As principais técnicas utilizadas dentro da análise estatística multivariada são análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*), análise de agrupamento hierárquico (HCA, do Inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) e método dos quadrados mínimos parciais (PLS, do inglês *Partial Least Squares*) (FERREIRA, 2015). adilson@unisc.br

Na determinação de nitrogênio em tecido vegetal, diferentes autores têm indicado os potenciais da espectroscopia no infravermelho aliado aos métodos quimiométricos. Este método possui técnicas promissoras

que podem vir a substituir, com a qualidade e a especificidade necessária, as técnicas analíticas clássicas, destacando-se, principalmente, pela possibilidade de análise múltipla da composição das amostras, rapidez e produtividade dos resultados, além da não utilização de reagentes químicos para obtenção de resultados. Entretanto, adquirir o equipamento para análise por espectroscopia no infravermelho requer um custo inicial relativamente alto, juntamente com o desenvolvimento ou utilização de um sistema externo para interpretação dos resultados, aliado às análises quimiométricas multivariadas (AMORIM, 1996).

Os resultados obtidos na utilização da espectroscopia no infravermelho no NIR para determinação de nitrogênio, tanto em tecido vegetal de milho e soja (SANTOS, SANTOS e KORNDÖRFER, 2012), quanto em cana-de-açúcar (SANTOS, SANTOS e KORNDÖRFER, 2010), foram satisfatórios quando comparados aos métodos tradicionais. Na técnica tradicional, o teor de nitrogênio para cultura de milho e soja ficaram entre 19-39 g kg<sup>-1</sup> N e 40-62 g kg<sup>-1</sup> N respectivamente, enquanto pelo NIR foi quantificado 19-42 g kg<sup>-1</sup> e 44-62 g kg<sup>-1</sup> N. Observa-se, portanto, uma boa correlação entre o método de Kjeldahl e o NIR de 0,79 e 0,85 para as culturas de milho e soja. Desta forma, a técnica tende a garantir a eficiência e seu potencial de utilização em laboratórios de análise foliar e de solos.

Diante do exposto, o presente trabalho foi desenvolvido afim de analisar amostras de tecido vegetal para determinação do teor de nitrogênio por meio de uma metodologia analítica inovadora, fazendo uso de uma mesa auto-amostradora para aquisição dos espectros sob condições de operação previamente determinadas e aliando os métodos de análise quimiométrica multivariada para interpretação dos resultados obtidos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Aquisição e preparo das amostras

As amostras de tecido vegetal de 20 amostras de folhas de milho, sorgo, noz-pecã, *Brachiara Decumbens* e gérbera foram cedidas pela Central Analítica da UNISC. Após secagem em estufa a 50 ± 4°C por 24h foram moídas a fim de obter um particulado com diâmetro menor que 0,5 mm.

### 2.2 Avaliação de nitrogênio pelo método Kjeldahl

Para a determinação do nitrogênio foi utilizado o método da oxidação com o ácido perclórico descrito no Manual de Métodos Analíticos Oficiais (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007). O método baseia-se na amonificação de todas as formas não amoniacais de nitrogênio, seguida da destilação alcalina da amônia via destilador Kjeldahl, que é recebida numa quantidade em excesso de ácido bórico. Dessa forma, a amônia fixada é titulada com ácido padronizado. Os resultados quantitativos de nitrogênio das amostras de tecido vegetal foram fornecidos pela Central Analítica da UNISC (<https://www.unisc.br/pt/central-analitica/quem-somos>).

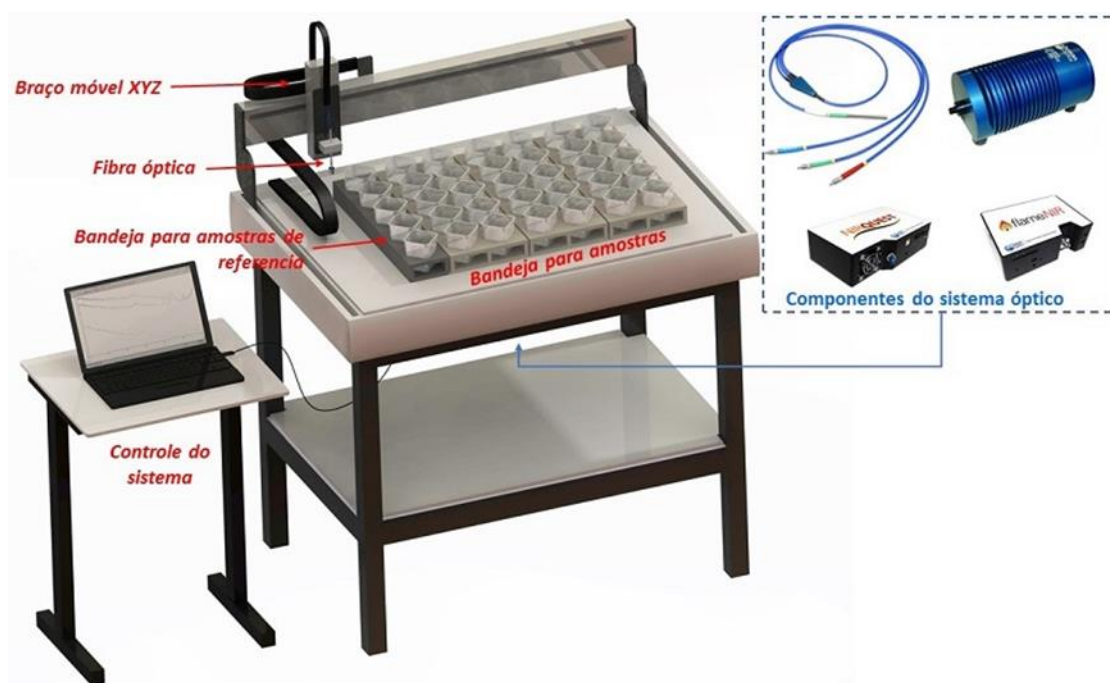
### 2.3 Montagem do sistema auto-amostrador e aquisição de dados

O sistema montado para obtenção dos espectros foi uma mesa auto-amostradora com capacidade de análise de 40 amostras, incluindo uma que é usada como calibração (Figura 1). A aquisição de dados foi feita utilizando um sistema de movimentação robótica tipo XYZ, que movimentou um cabo de fibra óptica, conectado a um sistema com fenda selecionável de 5 a 200 micron, onde a faixa de operação ocorre entre 450 e 2450 nm,

composto por um espectrofotômetro NIR e VIS-NIR e uma fonte halógena com um sistema de obturação optomecânica. Os componentes para a montagem da mesa foram adquiridos com a Fooze Tecnologia LTDA. (Curitiba, PR) e o sistema óptico com a Ocean Optics (US).

As amostras foram analisadas em quintuplicata utilizando um espectro médio para representação de cada uma. Foram realizadas varreduras em uma faixa de 960 a 2.400 nm, por meio de um sistema de espectrômetros com fibra óptica e no modo de absorbância, com uma área de varredura de 4 cm<sup>2</sup> e com velocidade de 6 amostras por minuto, conforme orientações do fabricante. O sistema atuou com uma resolução de 3,2 nm na região de 960 a 2.400 nm. A distância entre a fibra óptica e a superfície da amostra na aquisição dos espectros foi definida em 1 mm, que corresponde a menor distância possível, evitando a atração de partículas de tecido vegetal por eletricidade estática.

**Figura 1. Ilustração do sistema auto-amostrador para aquisição dos espectros de reflectância.**



#### 2.4 Desenvolvimento dos modelos de calibração

Os modelos de calibração multivariada para nitrogênio foram realizados através da Regressão pelo Método dos Quadrados Mínimos Parciais (PLS), utilizando o software SOLO + MIA (Eigenvector Research, Inc), versão 8.6.1 (2018). Os espectros de infravermelho obtidos foram exportados para a planilha eletrônica Microsoft Excel®, correspondendo à matriz X de dados. Os resultados de concentração determinados através do método de referência para nitrogênio também foram registrados em planilha Microsoft Excel®, correspondendo a matriz Y de dados.

Para melhorar o desempenho dos modelos de calibração e reduzir erros na aquisição dos espectros, diferentes ferramentas de pré-processamentos dos espectros foram avaliadas (RINNAN, BERG e ENGELSEN, 2009). O número de variáveis latentes utilizadas nos modelos foi determinado com base no menor valor do erro médio quadrático de calibração (RMSEC, do inglês, *Root Mean Square Error of Calibration*) e o erro médio

quadrático de validação cruzada (RMSECV, do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*), destacando-se o RMSECV (BRERETON, 2000; GEMPERLINE, 2006).

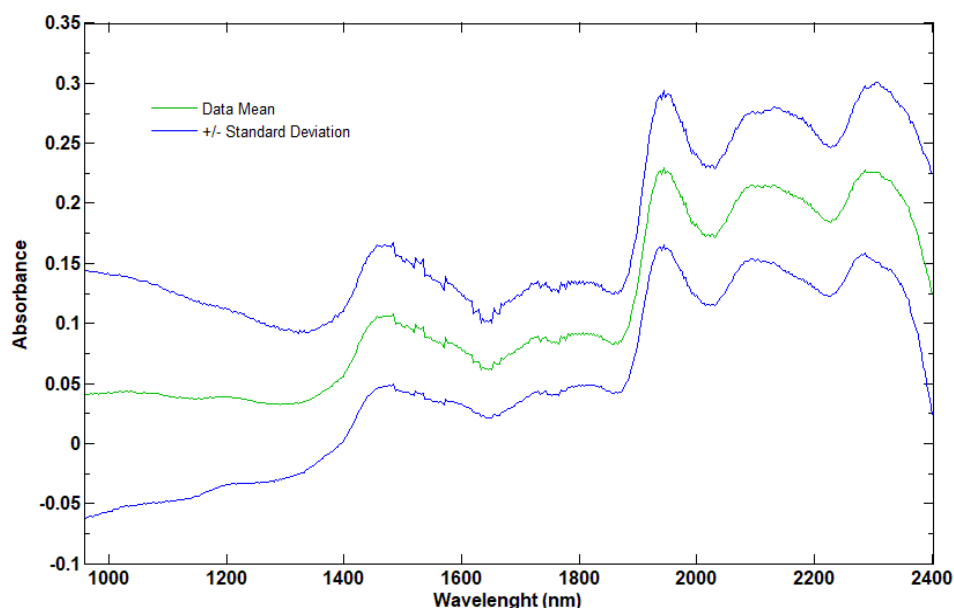
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de nitrogênio encontrado nas 20 amostras de tecido vegetal das diferentes culturas, de acordo com a metodologia de referência (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007), variou entre 4,77 a 36,69 g kg<sup>-1</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1. Resultados da concentração de nitrogênio das amostras de tecido vegetal.**

Amostra	Cultura	Resultado, g kg <sup>-1</sup>
N1	Milho	6,44
N2	Sorgo	13,42
N3	Milho	6,03
N4	Noz-pecã	13,73
N5	Sorgo	12,22
N6	Milho	8,43
N7	<i>Brachiara Decumbens</i>	6,24
N8	Milho	6,13
N9	Milho	5,75
N10	Sorgo	7,02
N11	Milho	34,90
N12	Milho	32,97
N13	Milho	4,77
N14	Milho	32,14
N15	Gérbera	17,44
N16	Milho	5,62
N17	Noz-pecã	16,80
N18	Noz-pecã	16,35
N19	Milho	36,69
N20	Noz-pecã	16,91

A Figura 2 apresenta o espectro médio ( $\pm$  desvio padrão) das amostras de tecido vegetal, na região entre 960 nm e 2.400 nm. Na literatura, tem-se que as regiões compreendidas entre 1.400-1.600 nm referem-se ao primeiro sobretom do alongamento N-H e O-H (JERRY & WEYER, 2012). Ecartot, Compan e Roumet (2013) em seus estudos, observaram bandas de absorção fortes na região de 1100–2500 nm, principalmente devido à influência da água (bandas de absorção em 1440 nm e 1900 nm) e proteínas (entre 2000 e 2300 nm).

**Figura 2. Espectros NIR obtidos das amostras de tecido vegetal.**

Para a construção dos modelos de PLS a matriz X contendo as variáveis independentes (espectros), foi relacionada de forma a obter uma relação linear com a matriz Y correspondente aos resultados analíticos da concentração química de cada amostra. Posteriormente, foram avaliadas as aplicações de diferentes ferramentas de pré-processamentos dos espectros, que melhor condicionem as matrizes de dados para a construção dos modelos de calibração (Tabela 2). Desta forma, o pré-processamento dos espectros mais adequado foi aquele aplicando normalização (inf-Norm, máximo = 1), seguida de primeira derivada (Savitsky-Golay); e centrado na média (MC, do inglês, Mean Center), apresentando menores erros de validação cruzada (RMSECV = 2,22%), utilizando 5 variáveis latentes.

**Tabela 2. Resultados dos modelos de calibração para determinação de nitrogênio por PLS em amostras de tecido vegetal.**

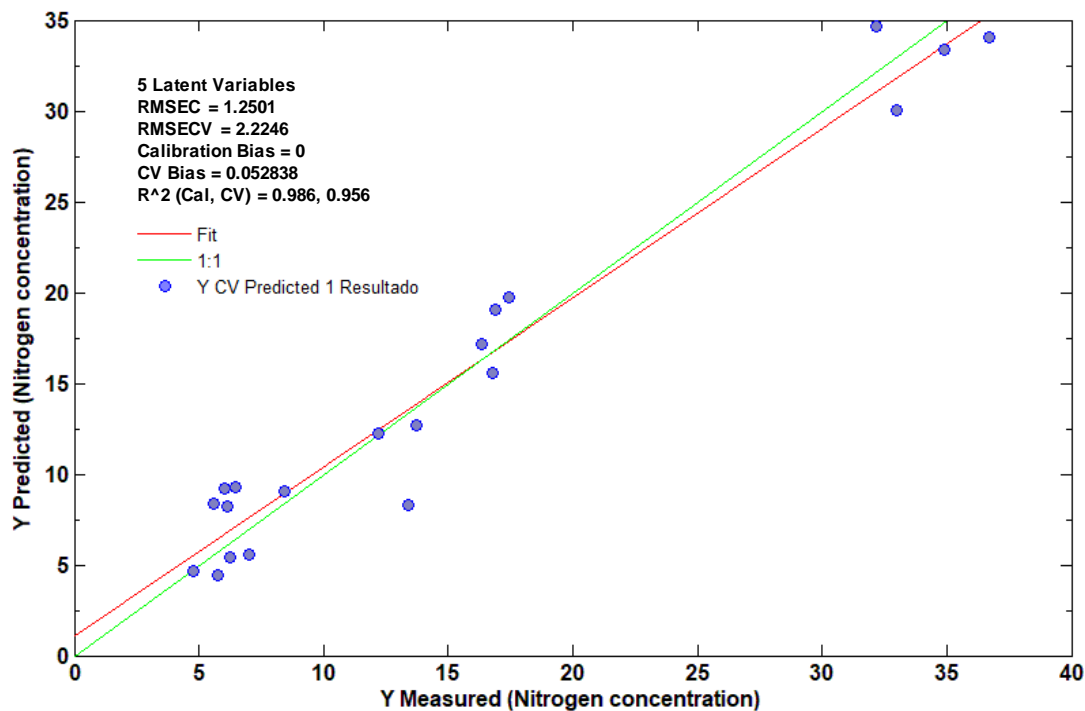
Pré-processamento	Região espectral (nm)	VL	RMSECV	RMSEC	R <sup>2</sup> <sub>cal</sub>
1D + MC	960-2.400	4	3,23	1,90	0,967
2D + MC	960-2.400	3	3,74	2,48	0,944
1D + OSC + MC	960-2.400	3	3,88	1,67	0,975
<b>Normal + 1D + MC</b>	<b>960-2.400</b>	<b>5</b>	<b>2,22</b>	<b>1,25</b>	<b>0,986</b>
Normal + 2D + MC	960-2.400	2	3,39	2,39	0,948

Normal: normalização (Norm-inf, max = 1); MC: centrado na média; 1D: primeira derivada (Savitsky-Golay); 2D: segunda derivada (Savitsky-Golay); OSC: correção ortogonal de sinal; VL: variável latente; RMSECV: Raiz do erro quadrático médio de validação cruzada; RMSEC: Raiz do erro quadrático médio de calibração; R<sup>2</sup><sub>cal</sub>: coeficiente de determinação. A linha destacada indica o melhor modelo.



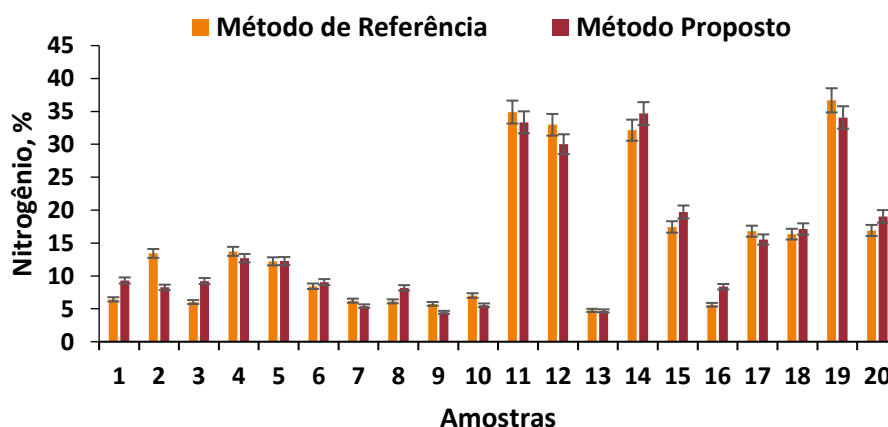
A Figura 3 ilustra os resultados obtidos nos modelos desenvolvidos para a determinação de nitrogênio. Utilizando 5 fatores, observa-se que o modelo de calibração atendeu as expectativas, apresentando  $R^2$  cal 0,986; RMSEC 1,250 g kg<sup>-1</sup> e RMSECV 2,225 g kg<sup>-1</sup>.

**Figura 3. Correlação entre os valores medidos (Y measured) de nitrogênio pelo método de referência e os resultados previstos (Y predicted) pelo modelo PLS.**



A Figura 4 apresenta um gráfico comparativo entre os resultados obtidos para o conjunto de amostras de calibração. Na comparação entre os resultados obtidos pela metodologia de referência (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007) e a metodologia proposta, não foram identificadas diferenças significativas ( $p = 0,987$ ).

**Figura 4. Valores médios e respectivos desvio padrão (n=3) obtidos na determinação de nitrogênio pela metodologia de referência e pela metodologia proposta.**



Santos, Santos e Korndörfer (2012) avaliaram o emprego da técnica NIR para análises de nitrogênio foliar de milho e soja, obtendo através do teste *t student* (5% de probabilidade) uma alta correlação, com coeficientes de 0,79 e 0,85 para milho e soja, respectivamente. Além disso, os resultados também indicaram que o método padrão (Kjeldahl) e o NIR não diferiram significativamente, expressando uma confiabilidade aceitável.

A utilização da mesa autoamostradora para a aquisição dos espectros de infravermelho próximo apresentou vantagens em relação a outros equipamentos que usam a técnica NIR. A sua automatização e capacidade de análise de 40 amostras, permite que seja feita a medição de um número maior de amostras em um menor intervalo de tempo, ou seja, não há a necessidade de troca das amostras e permanência do analisador frente ao equipamento. Além disso, vem se estudando a possibilidade de análise em tempo real, com a criação de um programa específico que realiza o tratamento dos dados obtidos simultaneamente.

Neste contexto, a Tabela 3 apresenta as principais figuras de mérito da metodologia desenvolvida neste estudo.

**Tabela 3. Figuras de mérito e configurações do equipamento para determinação de nitrogênio em tecido vegetal.**

Característica	Nitrogênio
Faixa de trabalho, g kg <sup>-1</sup>	4,77 - 36,69
Velocidade de determinação, amostra/min	6
Área de varredura, cm <sup>2</sup>	4
Distância entre a fibra ótica e a superfície da amostra, mm	1
Região espectral, nm	960-2.400
Pré-processamento	Normal + 1D + MC
Variáveis latentes	5
RMSEC, g kg <sup>-1</sup>	1,25
RMSECV, g kg <sup>-1</sup>	2,22
Coeficiente de determinação (calibração) R <sup>2</sup>	0,986

## 4 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo comprovaram que o sistema proposto para análise automatizada de amostras de tecido vegetal por espectroscopia NIR é compatível com a metodologia de referência, podendo ser implementada em laboratório de controle de qualidade. Além disso, comprovou-se que a espectroscopia é um método livre de reagentes químicos, rápido e que requer preparo mínimo de amostra, perfeitamente adequado às práticas de química analítica verde.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Secretaria de Desenvolvimento Econômico, à Ciência e Tecnologia do Estado Rio Grande do Sul, à Central Analítica da UNISC, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



## REFERÊNCIAS

- BREMNER J.M. Total Nitrogen. Methods of soil analysis Part 2- Chemical and Microbiological Properties, number 9 in the series Agronomy. *American Society of Agronomy, Inc., Publisher USA*, p.1149-1178, 1965.
- BRERETON, Richard G. Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, v. 125, n. 11, p. 2125-2154, 2000.
- ECARNOT, Martin; COMPAN, Frédéric; ROUMET, Pierre. Assessing leaf nitrogen content and leaf mass per unit area of wheat in the field throughout plant cycle with a portable spectrometer. *Field Crops Research*, v. 140, p. 44-50, 2013.
- FERREIRA, Márcia Miguel Castro. *Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações*. Campinas: Ed. da UNICAMP, 493 p., 2015.
- GEMPERLINE, Paul. Practical guide to chemometrics. *CRC press*, 2006.
- WORKMAN JR, Jerry; WEYER, Lois. Practical Guide and Spectral Atlas for Interpretive Near-Infrared Spectroscopy, *CRC Press*, 2012.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E. A. *Manual de métodos analíticos oficiais para fertilizantes minerais, orgânicos, organominerais e corretivos*: MAPA Brasília 2007.
- MCGRATH, J. M.; SPARGO, J.; PENN, C. J. Soil Fertility and Plant Nutrition. In: VAN ALFEN, N. K. (Ed.). *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*. Oxford: Academic Press, 2014. p.166-184.
- MUÑOZ-HUERTA, Rafael F. et al. A review of methods for sensing the nitrogen status in plants: advantages, disadvantages and recent advances. *Sensors*, v. 13, n. 8, p. 10823-10843, 2013.
- PASQUINI. Near infrared spectroscopy: A mature analytical technique with new perspectives – A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1026, p. 8-36, 2018.
- RESENDE, A. Análise foliar complementa adubação do milho. *Campo&Negócio*, 2014. p. 18-23.
- RINNAN, Åsmund; VAN DEN BERG, Frans.; ENGELSEN, Søren Balling. Review of the most common preprocessing techniques for near-infrared spectra. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 10, p. 1201-1222, 2009.
- SANTOS, Gustavo Alves; PEREIRA, Alan Bueno & KORNDÖRFER, Gaspar Henrique. Uso do sistema de análise por infravermelho próximo (NIR) para análise de matéria-orgânica e fração de argila em solos e teores foliares de silício e nitrogênio em cana-de-açúcar. *Bioscience Journal*, 26:100-108, 2010.
- SANTOS, Gustavo Alves; SANTOS, Ana Paula dos & KORNDÖRFER, Gaspar Henrique. Sistema por infravermelho próximo (NIR) para análises de nitrogênio foliar. *Bioscience Journal*, 28:83-90, 2012.
- YASUHARA, Tadashi, NOKIHARA, Kiyoshi. High-throughput analysis of total nitrogen content that replaces the classic Kjeldahl method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, p.4581-4583, 2001.
- YANG, Haiqing; MOUAZEN, Abdul M. Vis/near and mid-infrared spectroscopy for predicting soil N and C at a farm scale. *Infrared Spectroscopy—Life and Biomedical Sciences*: 185-210, 2012.