

## ● CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

### ESTUDO DA REDUÇÃO DE REAGENTES NA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM ALIMENTOS - MÉTODO DE *KJELDAHL*

*\* Claudia Maria Tomás Melo<sup>1</sup>, Samara Ferreira Araújo<sup>2</sup>,  
Carla Regina Amorim dos A. Queiroz<sup>1</sup>, Eduardo Santos Almeida<sup>3</sup>*

**RESUMO:** Os métodos de determinação de proteínas em alimentos normalmente baseiam-se na determinação de nitrogênio, sendo que o método de Kjeldahl é considerado padrão. O objetivo deste trabalho foi propor a redução da quantidade de reagentes utilizados e resíduos gerados nesta análise química, além dos custos operacionais. A metodologia consistiu em três etapas básicas: digestão, destilação e titulação, as quais utilizam grandes quantidades de reagentes, tais como ácido sulfúrico p.a, hidróxido de sódio 50% m/v, além de catalisador para reduzir o tempo da digestão da amostra e ácido bórico a 4% m/v para recolher o nitrogênio proveniente das proteínas. Para isso, foram realizados experimentos, consistindo de 4 tratamentos com 5 repetições, visando reduzir a quantidade e concentração dos reagentes. Em cada tratamento proposto foi reduzida determinada quantidade dos reagentes utilizados nesta análise. A determinação de proteínas foi realizada em amostras de 10 alimentos, sendo verificado que é possível reduzir em aproximadamente 50% os reagentes utilizados pelo método em questão. Tal ponto vai de encontro à química verde, que ainda é desvalorizada em muitos laboratórios de ensino e pesquisa. A química verde busca fazer com o que a indústria elimine ou atenuar os impactos de seus processos e produtos, tornando os processos químicos ambientalmente mais eficientes.

**Palavras-chave:** Análises de alimentos. Química verde. Redução de resíduos.

### STUDY OF REDUCING REAGENTS IN THE DETERMINATION OF PROTEINS IN FOODS - *KJELDAHL* METHOD

**ABSTRACT:** Protein determination methods in foods are usually based on nitrogen determination, and the Kjeldahl method is considered standard. The objective of this work was to propose the reduction of the amount of reagents used and residues generated in this chemical analysis, besides the operational costs. The methodology consisted of three basic steps: digestion, distillation and titration, which use large quantities of reagents, such as sulfuric acid, 50% m/v sodium hydroxide, and catalyst to reduce sample digestion time and boric acid to 4% m/v to collect nitrogen from proteins. For this, experiments were performed, consisting of 4 treatments with 5 repetitions, aiming to reduce the amount and concentration of reagents. In each proposed treatment a certain amount of reagents used in this analysis was reduced. Protein determination was performed on samples of 10 foods, and it was found that it is possible to reduce by approximately 50% the reagents used by the method in question. This goes against green chemistry, which is still undervalued in many teaching and research laboratories. Green chemistry seeks to make industry eliminate or mitigate the impacts of its processes and products, making chemical processes more environmentally efficient.

**Keywords:** Food analysis. Green chemistry. Waste reduction.

\* Autor correspondente: claudiamelo@iftm.edu.br

1 Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> do Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM, *Campus* Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. claudiamelo@iftm.edu.br, carlaregina@iftm.edu.br

2 Estudante curso Tecnólogo em alimentos, Instituto Federal do Triângulo Mineiro – IFTM, *Campus* Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil. samara\_euback@hotmail.com

3 Técnico de laboratório do Instituto Federal do Triângulo Mineiro - *Campus* Uberlândia, eduardoalmeida@iftm.edu.br

## INTRODUÇÃO

Muitos métodos têm sido propostos para a determinação de proteínas, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os alimentos.

Segundo se observa os fatores influentes na escolha do melhor método a ser utilizado são a sensibilidade, o custo e a rapidez (MIWA; FALCO; CALIJURI, 2008).

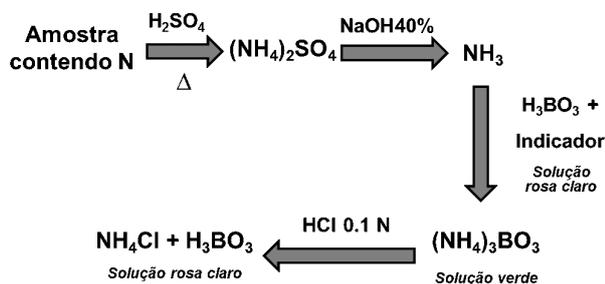
Estudos comparativos de metodologias para a determinação de proteínas sempre foram de grande interesse para profissionais da indústria de alimentos (CECCHI, 2003).

A determinação de proteínas através do Nitrogênio Total foi proposta por *Johann Kjeldahl*, químico dinamarquês, que descobriu um processo relativamente fácil e rápido de se determinar nitrogênio em matéria orgânica, se tornando historicamente o método de referência, mesmo sofrendo várias modificações, para determinação do conteúdo de proteínas, além de ser usado para calibração e validação de métodos alternativos de determinação de proteínas (GREENFIELD; SOUTHGATE, 2003; LOPES; SANTANA, 2005).

O método desenvolve-se em três etapas distintas: digestão da amostra por ação de ácido sulfúrico concentrado, utilizando catalisador para acelerar esta etapa; destilação do nitrogênio e titulação ácida (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984).

O método utiliza ácido sulfúrico concentrado, aquecimento e catalisador para fins de destruição da matéria orgânica. Na etapa de digestão há a formação e liberação de  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ , além de sulfato de amônio -  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -, que através da destilação libera amônia ( $\text{NH}_3$ ), a qual é recolhida em solução de ácido bórico. O nitrogênio, ao ser recolhido por essa solução, forma o borato de amônio -  $(\text{NH}_4)_3\text{BO}_3$  - que é, então, titulado com ácido padronizado e, através da amônia formada -  $\text{NH}_3$  formada, é quantificado (MELO, 2005), conforme apresentado na Figura 1.

**Figura 1** - Esquema do método de Kjeldahl, mostrando as principais etapas, reagentes e soluções utilizadas.



**Fonte:** Adaptado de Melo, 2005.

Em 1885, foram realizados testes, utilizando catalisadores, os quais têm a função de acelerar a reação química ocorrida na etapa de digestão do método de *Kjeldahl*. Essa etapa que tem como digestor o ácido sulfúrico, foi testada com vários metais da tabela periódica sendo o mercúrio, o cobre e o selênio, os que apresentaram melhores resultados (CECCHI, 2003). Os catalisadores aumentam a velocidade de digestão,

quando utilizados em baixas concentrações, e não têm praticamente nenhum efeito quando utilizados em altas concentrações. Atualmente, se utiliza uma mistura dos sais sulfato de potássio e sulfato de cobre na proporção de 10:1. O sulfato de potássio é usado para elevar o ponto de evaporação do ácido sulfúrico e aumentar o poder de oxidação na digestão da mistura, enquanto o sulfato de cobre apresenta menor eficiência e apresenta limite de aplicação devido a sua toxidez (CECCHI, 2003; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985).

No método de Kjeldahl, a recuperação do nitrogênio é superior a 98%, quando utilizado de forma correta (LYNCH; BARBANO, 1999). O método, além de ser conhecido mundialmente, é confiável, simples, sendo as análises facilmente desenvolvidas por técnicos que possuam experiência geral em laboratório químico, de baixo custo, requer utilização de uma aparelhagem e reagentes pouco onerosos e comuns a vários laboratórios de análises, porém, é muito laborioso e requer uma grande quantidade de reagentes (MELO, 2005; FERREIRA, MONTEIRO, SILVA, 2007).

Uma das estratégias recomendadas para adequar o método de *Kjeldahl* à realidade de "química verde", buscando sustentabilidade, é substituir ou diminuir a quantidade de reagentes utilizada, ou ainda, modificar procedimentos analíticos (SIMEONE, 2005).

Existem doze tópicos que precisam ser perseguidos ao se pretender implantar a química verde, seja na indústria ou Instituição de Ensino e Pesquisa na área de química (LENARDÃO et al., 2008): prevenção, economia de átomos, síntese de produtos menos perigosos, desenho de produtos seguros, solventes e auxiliares mais seguros, eficiência de energia, uso de fontes renováveis de matérias primas, evitar a formação de derivados, catálise, desenho para a degradação, análise em tempo real para prevenção de poluição e química intrinsecamente segura para prevenção de acidentes.

Visando diminuir resíduos gerados e custos operacionais, este trabalho teve como objetivo a redução na quantidade de reagente para a determinação do nitrogênio total (N) e, consequentemente, proteína bruta (PB) pelo método de *Kjeldahl* em alimentos, sejam de origem animal e vegetal.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas análises do teor de proteínas, utilizando o método de *Kjeldahl*, em amostras de alimentos de origem animal (ovo, carne bovina moída, hambúrguer, concentrado proteico, leite) e vegetal (couve, feijão preto, farinha de mandioca, soja e alho), todos adquiridos em comércios da cidade de Uberlândia-MG. Os alimentos foram escolhidos aleatoriamente, mas buscando representantes do reino animal e vegetal com teores de proteínas variados. As análises foram realizadas no Laboratório de Análises Físico-Químicas do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro - *Campus* Uberlândia.

O experimento consistiu em 4 tratamentos T1 a T4 (Tabela 1) com 5 repetições, totalizando 20 parcelas experimentais para cada alimento. A massa de cada alimento analisado foi fixada em 200 mg.

**Tabela 1.** Tabela contendo os reagentes e as suas proporções de redução nos tratamentos.

Reagentes	Proporção dos reagentes			
	T1*	T2	T3	T4
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> p.a (mL)	5,0	4,5	4,0	3,5
NaOH (50%) (mL)	20,0	17,0	14,0	10,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> (4%) (mL)	20,0	17,0	14,0	10,0
Catalisador (g) #	2,0	1,5	1,0	0,5

\* Padrão do método (Silva e Queiroz, 2009).

# K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 10:1.

O preparo das amostras para análises foi realizado de acordo com o tipo de alimento. Soja, alho e o feijão preto foram triturados para aumentar a superfície de contato. O hambúrguer, a carne bovina moída, a farinha, o ovo, o *whey protein* e o leite foram homogeneizados antes da coleta da amostra. A couve foi picada manualmente até a obtenção de pedaços similares aos obtidos pela trituração.

A determinação de proteínas pelo método de Kjeldahl seguiu a metodologia padrão de Silva e Queiroz (2009). Para a etapa de digestão pesou-se aproximadamente 0,2 g das amostras (precisão de 0,0001 g), em tubo digestor micro-Kjeldahl, adicionou-se a mistura catalítica (constituída por sulfato de potássio e sulfato de cobre pentahidratado 10:1) e o ácido sulfúrico p.a. pela parede do frasco. Procedeu-se com a digestão das amostras em bloco digestor (SOLAB, SL - 25/40) com elevação gradual da temperatura até 400 °C por aproximadamente 3 horas. Manteve-se a digestão até que a solução ficasse com tonalidade verde clara ou incolor, indicando o final desta etapa.

Posteriormente à etapa de digestão, aguardou-se o resfriamento e em seguida acoplou-se o tubo digestor micro-Kjeldahl ao destilador de nitrogênio, adicionando-se ao tubo solução de NaOH 50% m/v, conforme quantidades especificadas na Tabela 1. O nitrogênio da amostra foi, então, recolhido em um erlenmeyer contendo solução de ácido bórico 4% m/v com quatro gotas de indicador misto (solução etanólica constituída por 0,067% m/v de vermelho de metila e 0,03% m/v de verde de bromocresol), observando a mudança de coloração da solução de vermelho para verde e deixando-se recolher mais 50 mL do destilado após a viragem do indicador.

Finda a etapa de recolhimento da amônia, foi realizada a titulação da solução contendo o borato de amônio, com ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> padronizado, até a viragem do indicador para a coloração rosa claro.

Através das Equações 01 e 02 foi possível obter a porcentagem de nitrogênio total e proteínas, respectivamente, das amostras em análise.

$$\% \text{ Nitrogênio total} = \frac{V * M * f * 0,014 * 100}{p} \quad (1)$$

$$\% \text{ Proteínas} = \% \text{ Nitrogênio total} * F \quad (2)$$

Em que:

V: volume, em mL, de ácido clorídrico 0,1 mol L<sup>-1</sup> gastos na titulação;

p: massa da amostra em gramas;

F: fator de conversão de nitrogênio em proteínas.

f: fator de correção da solução do ácido clorídrico;

M: molaridade teórica da solução de ácido clorídrico;

A porcentagem de proteínas total foi obtida, multiplicando-se o teor de nitrogênio pelo fator F que converte nitrogênio em proteínas. Para o feijão preto e a soja foi utilizado F igual a 5,71, para o leite, 6,38 e para os demais alimentos um F igual a 6,25.

O experimento foi realizado em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos e um total de 20 parcelas experimentais para cada alimento analisado. Os resultados foram avaliados através de análise de variância e teste de médias de Tukey (programa ESTAT®). A análise foi realizada admitindo-se nível de probabilidade de 99 % (p<0,01) (BARBOSA; MALHEIROS; BANZATTO, 1992).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de proteína nos alimentos selecionados mostrou que, para a carne bovina moída, hambúrguer bovino e *whey protein* (Tabela 2), não houve diferença significativa no teor de proteínas para os tratamentos propostos, ou seja, mesmo reduzindo a quantidade em volume de ácido sulfúrico em 30%, hidróxido de sódio e ácido bórico em 50% e catalisador em 75%. No caso das amostras de ovo e leite, verificou-se que houve diferença significativa no teor de proteínas no último tratamento, ou seja, foi possível a redução dos reagentes até o tratamento 3 (T3) sem diferença estatística nos resultados.

**Tabela 2.** Porcentagem (g 100 g<sup>-1</sup>) de proteínas nos produtos de origem animal em função de diferentes quantidades de reagentes utilizados.

T	Carne Bovina Moída <sup>ns</sup>	Hambúrguer Bovino <sup>ns</sup>	Ovo **	Leite **	Concentrado proteico <sup>ns</sup>
T1	20,75 ± 0,38 a	12,31 ± 4,13 a	12,96 ± 0,95 a	3,42 ± 0,34 a	23,03 ± 0,99 a
T2	20,20 ± 0,24 a	13,61 ± 0,39 a	13,18 ± 0,58 a	3,68 ± 0,51 a	24,24 ± 1,28 a
T3	20,89 ± 0,26 a	14,01 ± 0,85 a	12,82 ± 0,47 a	3,41 ± 0,18 a	23,04 ± 0,99 a
T4	17,60 ± 6,28 a	13,10 ± 2,72 a	8,48 ± 3,88 b	0,80 ± 0,77 b	22,35 ± 1,34 a

T = Tratamento, conforme explícito na Tabela 1.

\*\* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p < 0,01)

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade (0,01 ≤ p < 0,05)

<sup>ns</sup> não significativo (p ≥ 0,05)

Em relação aos produtos de origem vegetal, alho, feijão e soja (Tabela 3), também não houve diferença significativa no teor de proteínas independente do tratamento realizado, semelhantemente aos produtos carne moída, hambúrguer e *whey protein*. A porcentagem de proteínas da farinha de mandioca diferiu no

tratamento T2 em relação do tratamento T1, não apresentando diferença significativa em relação aos demais tratamentos, onde houve maior redução de reagentes. Para a couve, o teor de proteínas, foi semelhante quando obtidos pelos tratamentos T1 e T2, diferindo dos tratamentos T3 e T4, que foram semelhantes entre si. Esta diferença pode estar relacionada a redução excessiva dos reagentes, conforme mencionado acima. No tratamento T4, para carne bovina, o desvio padrão foi extremamente elevado e, considera-se, que isto se deva à redução excessiva dos reagentes.

**Tabela 3.** Teor médio de proteínas de produtos de origem vegetal em função de diferentes quantidades de reagentes para reação (T).

T	Alho <sup>ns</sup>	Farinha de Mandioca <sup>**</sup>	Feijão Preto <sup>ns</sup>	Soja <sup>ns</sup>	Couve <sup>**</sup>
T1	18,21 ± 0,61 a	1,54 ± 0,19 a	20,04 ± 0,63 a	29,98 ± 1,60 a	4,26 ± 0,19 a
T2	15,07 ± 7,44 a	1,19 ± 0,23 b	19,34 ± 2,97 a	29,66 ± 0,82 a	4,20 ± 0,09 a
T3	19,55 ± 1,01 a	1,49 ± 0,11 ab	20,12 ± 1,20 a	28,65 ± 1,52 a	3,19 ± 0,38 b
T4	19,51 ± 2,93 a	1,49 ± 0,18 ab	19,73 ± 1,91 a	29,50 ± 8,52 a	3,05 ± 0,36 b

T = Tratamento, conforme explícito na Tabela 1.

<sup>\*\*</sup> significativo ao nível de 1 % de probabilidade (p < 0,01)

\* significativo ao nível de 5 % de probabilidade (0,01 =< p < 0,05)

<sup>ns</sup> não significativo (p >= 0,05)

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011), o teor de médio de proteínas, obtidos pelo método de Kjeldahl, é de 20,74% no feijão preto, 1,36% na farinha, 3,10% no leite e 12,00% no hambúrguer, valores próximos aos resultados obtidos nesta pesquisa.

A porcentagem de proteínas obtida em alho, feijão preto e soja, independentemente do tratamento realizado – redução de reagentes - foi estatisticamente igual para cada alimento em específico. Em relação à farinha de mandioca, verifica-se que o tratamento 2 diferiu do tratamento 1, mas foi igual aos demais. Para couve, alimento que possui baixa porcentagem de proteínas, verificou-se que os tratamentos 3 e 4 diferiam do tratamento 1 e 2.

A reação entre o ácido sulfúrico p.a , utilizado na etapa inicial da digestão da amostra, e o hidróxido de sódio, utilizado na etapa de destilação (Equação 3), com a finalidade de liberar o N proveniente do sulfato de amônio, mostra que há uma relação direta, estequiométrica, entre estes dois reagentes.



Considerando ácido sulfúrico com 95% de pureza e densidade 1,84 g mL<sup>-1</sup>, as massas de ácido (Tabela 3) correspondentes ao volume de 5,00 mL (T1) e 3,5 mL (T4) são, respectivamente, 8,74 g e 6,12 g. Fazendo os cálculos das quantidades equivalentes (estequiométricas) de hidróxido de sódio (100% de pureza) para neutralizar o ácido após a etapa de digestão, tem-se 7,35 g (T1) e 4,99 g (T4), correspondendo a um volume de hidróxido de sódio a 50% m/v de 14,22 mL (T1) e 10 mL (T4).

Pelos cálculos realizados, verifica-se que são necessários exatamente 14,27 mL de solução de NaOH 50% m/v na etapa de destilação, para neutralizar os

5,00 mL de ácido sulfúrico utilizado na etapa de digestão. Dessa forma foi utilizado um excesso de 25% de solução de NaOH (Tabela 1) no tratamento T1. Esse excesso gera gastos para o laboratório, além de uma maior geração de resíduos. Para o volume de 3,5 mL (T4) de ácido sulfúrico, o volume de hidróxido de sódio adicionado foi 10 mL, estando no limite da estequiometria. Caso o hidróxido de sódio utilizado não apresente 100% de pureza, ter-se-ia um excesso do ácido no meio, portanto não haveria neutralização total do ácido, justificando os resultados experimentais (Tabela 1). Na Tabela 4, verifica-se que para os tratamentos T1 a T3 houve um excesso da massa de hidróxido de sódio no meio, comparativamente à estequiometria da reação, e isto pode ser explicado, pois parte do ácido sulfúrico é gasto na digestão da amostra. Para ter-se valores mais exatos seria necessário fazer uma titulação após a digestão para saber quanto de ácido sulfúrico efetivamente reagiria com o hidróxido de sódio.

**Tabela 4.** Quantidades adicionadas e estequiométricas de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio utilizadas no método de Kjeldahl, conforme os Tratamentos T1 a T4.

Tratamentos	Quantidades adicionadas em volume (mL) e seu correspondente em massa (calculado)							
	T1		T2		T3		T4	
	mL	g	mL	g	mL	g	mL	g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> p.a.	5,00	8,74	4,5	7,87	4,0	7,00	3,5	6,12
NaOH (50%)	20,00	10,00	17,00	8,50	14,00	7,00	10,00	5,00
Tratamentos	Quantidades estequiométricas (calculadas) em massa e em volume para neutralizar o ácido#							
	T1		T2		T3		T4	
	mL	g	mL	g	mL	G	mL	g
NaOH (50%)	14,27	7,13	12,84	6,42	11,42	5,71	10,00	5,00

# Uma das etapas do método consiste na neutralização do ácido sulfúrico pela solução de Hidróxido de sódio.

Levando em consideração a estequiometria da reação entre o ácido clorídrico e a solução de ácido bórico (T1), contendo o nitrogênio da amostra na forma de borato de amônio ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>), para um alimento com 50% m/m de proteínas (considerando fator de conversão de N em proteínas igual a 6,25%), isto equivale a 8% de N e, conseqüentemente, a uma massa final de borato de amônio de 0,05451 g, que representa um volume de solução de ácido bórico a 4 % m/v, necessário para recolher o nitrogênio da amostra, de apenas 1,36 mL, resultando em um excesso de 18,64 mL de solução de ácido bórico a 4%. Como é necessário um volume maior de ácido bórico para recolher o nitrogênio da amostra, a concentração da solução poderia ser reduzida a aproximadamente 0,28% m/v, ao invés de se reduzir o volume desta solução. A redução da concentração de ácido bórico de 4% m/v para 0,28% m/v gera uma redução em massa de 93% em ácido bórico, mostrando que é possível otimizar este método em relação às quantidades e concentrações de reagentes utilizadas.

Considerando eventuais impurezas, propõe-se a utilização de 20,0 mL de solução de ácido bórico a 0,4 % m/v, o que já constitui um ligeiro excesso para garantir a recolhimento do nitrogênio da amostra.

Silva et al. (2006) obtiveram teores de 40,8% m/m de proteína em grãos de soja, bastante superior aos obtidos nas amostras analisadas, mas esta diferença está relacionada com a cultivar, tipo de adubação, umidade entre outros fatores de variabilidade. Nesta pesquisa, o teor médio de proteínas em soja foi de 29,45% m/m, sendo que não houve diferença nos resultados, independentemente do tratamento realizado.

Segundo Alberguini (2005) e Simeone (2005), ações de gestão de resíduos de laboratórios devem minimizar e/ou evitar a geração de resíduos na fonte de origem. Para tentar contribuir com a sustentabilidade do planeta, além de modificar procedimentos analíticos, é necessário utilizar reagentes em quantidades estequiométricas, evitando descarte em excesso no meio ambiente. Portanto, otimizar o consumo de reagentes no método de Kjeldahl traz benefícios tanto para empresas e instituições de ensino quanto para o meio ambiente.

## CONCLUSÕES

Foi verificado que até o tratamento T3 praticamente não houve diferença significativa no teor de proteínas das amostras analisadas, indicando a possibilidade de redução de reagentes para o método de Kjeldahl em 20% de ácido sulfúrico concentrado, 30% de hidróxido de sódio 50% e ácido bórico a 4%, e 50% de catalisador, indicando um procedimento de acordo com os princípios mais próximos da química verde.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao IFTM pela disponibilidade do laboratório, equipamentos e reagentes.

## REFERÊNCIAS

- ALBERGUINI, L. B. A. Gerenciamento e tratamento de resíduos químicos. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE METODOLOGIA DE LABORATÓRIOS DA EMBRAPA, 10., São Carlos, 2005. **Resumos...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical chemists**. 14. ed. Washington, 1984.
- BARBOSA, J. C.; MALHEIROS, E. B.; BANZATTO, D. A. **ESTAT**: um sistema de análises estatísticas de ensaios agrônomicos. Jaboticabal: UNESP-FCAV, 1992.
- CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de Alimentos**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2003. 207p.
- FERREIRA, F. N.; MONTEIRO, M. I. C.; SILVA, L. I. D. Determinação de nitrogênio total em amostras de rocha petrolífera pelo Método Kjeldahl / Indofenol. In: JORNADA DO PROGRAMA DE CAPACITAÇÃO INTERNA DO CETEM, 1., 2007. Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: CETEM, 2007.
- LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 123-129, 2003.
- GREENFIELD, H.; SOUTHGATE, D. A. T. **Datos de composición de alimentos**: obtención, gestión, utilización. 2. ed. Roma: FAO, 2003. 321p.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985. v. 1, p. 533
- LOPES, D. C.; SANTANA, M. C. A. **Determinação de proteína em alimentos para animais**: métodos químicos e físicos. Viçosa: UFV, 2005. 98p.
- LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. **Journal of AOAC International**, v. 82, p. 1389-1398, 1999.
- MELO, E. I. **Análise Físico-Química de Alimentos**. SENAI, Uberlândia, 2005.
- MIWA, A. C. P.; FALCO, P. B.; CALIJURI, M. C. Avaliação de métodos espectrofotométricos para determinação de proteína em amostras de lagoas de estabilização. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 13, n. 2, p. 236-242, 2008.
- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 3.ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2009. 235 p.
- SILVA, M.S.; NAVESM M.M.V.; de OLIVEIRA, R.B.; LEITE, O.S.M. **Composição Química e Valor Protéico do Resíduo de Soja em Relação ao Grão de Soja**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 26, n. 3, p.571-576, 2006.
- SIMEONE, M. L. Implementação de um programa de gerenciamento de resíduos em laboratórios. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE METODOLOGIAS DE LABORATÓRIOS DA EMBRAPA, 10., São Carlos, 2005. **Resumos...** São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.
- NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4. ed. Campinas, SP: UNICAMP, 2011. Disponível em <[http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=taco\\_4\\_versao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.nepa.unicamp.br/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf)> Acesso em: 7 de ago. 2013.