

Revista Agrária Acadêmica

Agrarian Academic Journal

Volume 2 – Número 3 – Mai/Jun (2019)

doi: 10.32406/v2n32019/151-159/agrariacad

Avaliação da concentração dos componentes da solução de destilação sobre a quantificação do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl. Evaluation of the concentration of compounds in the distillation solution on the quantification of total nitrogen by the Kjeldahl method.

Giselle Priscila Costa^{1*}, Tadeu Eder Silva², João Paulo Pacheco Rodrigues³, Edenio Detmann⁴

^{1*} - Estudante de Mestrado em Zootecnia, bolsista da CAPES, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – UFV – VIÇOSA/MG – BRASIL, Avenida Marechal Castelo Branco, 641, Centro – Teixeira-MG, contato: (31) 99497-2331, email: giselle.costa@ufv.br

² - Estudante de Doutorado em Zootecnia, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – UFV – VIÇOSA/MG – BRASIL, email: tadeu.silva@ufv.br

³ - Professor Adjunto, Instituto de Estudos do Trópico Úmido, Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará – UNIFERSSA – XINGUARA/PA – BRASIL, email: joapaulo0511@hotmail.com

⁴ - Professor Associado, Pesquisador do CNPq e do INCT Ciência Animal, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – UFV – VIÇOSA/MG – BRASIL, email: e.detmann@hotmail.com

Resumo

A otimização dos reagentes na solução de destilação utilizada no método de Kjeldahl poderia ser uma importante estratégia para diminuir o risco à saúde ambiental e humana e consequente redução nos custos de análise. Foram testadas quatro soluções de destilação, combinando duas concentrações de ácido bórico (40 ou 20 g/L) e duas soluções alcoólicas de indicadores (vermelho de metila e verde de bromocresol, 25 mL/L e 12 mL/L ou 12,5 mL/L e 6 mL/L) em quinze amostras com baixo e alto N materiais. Demonstrou-se que a redução das concentrações destes reagentes não afeta a quantificação total de N em diferentes materiais.

Palavras-chave: ácido bórico, indicadores, proteína bruta, verde de bromocresol, vermelho de metila.

Abstract

Optimizing the reagents on distillation solution used in the Kjeldahl method could be an important strategy to decrease risk to environmental and human health and consequent reduction in analysis costs. Here, we tested four distillation solution combining two concentrations of boric acid (40 or 20 g/L) and two alcohol solutions of the indicators (methyl red and bromocresol green, 25 mL/L and 12 mL/L, or 12.5 mL/L and 6 mL/L) in fifteen samples of low- and high-N materials. We demonstrated that a reduction of concentrations of those reagents does not affect the total N quantification in the different materials.

Keywords: boric acid, bromocresol green, crude protein, indicators, methyl red.

Introdução

O método de Kjeldahl tem sido considerado como o método padrão para obtenção dos teores de proteína bruta (PB) em alimentos (SILVA e QUEIROZ, 2002). Este se baseia na quantificação do teor de nitrogênio (N) dos materiais a serem analisados. Nesse aspecto, embora existam diferenças entre as amostras, o teor de PB pode ser estimado multiplicando-se o teor N por um fator de conversão normalmente estabelecido em 6,25, baseando-se nos pressupostos de que todos os compostos nitrogenados são de natureza proteica e que estes possuem 16% de N em sua composição (POMERANZ e MELOAN, 1978; CHANG, 1998; SILVA e QUEIROZ, 2002; DETMANN et al., 2012).

Embora o método de Kjeldahl tenha sofrido alterações desde a sua proposição, o mesmo consiste basicamente em três etapas analíticas: digestão, destilação e titulação (DETMANN et al., 2012). Especificamente na etapa de destilação, o ácido bórico (AB) tem sido o reagente mais utilizado como componente da solução receptora para a fixação da amônia. Uma vez em contato com a amônia, este ácido forma o sal borato ácido de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$), cuja constante de dissociação é alta, permitindo a posterior quantificação por titulação em ácido (SILVA e QUEIROZ, 2002).

A concentração de AB na solução de destilação recomendada nas literaturas relacionadas à análise de alimentos é de 40 g/L (CHANG, 1998; SILVA e QUEIROZ, 2002; DETMANN et al., 2012). No entanto, estudos envolvendo potenciais riscos da exposição ou ingestão deste ácido por pessoas ou animais têm demonstrado que este pode afetar negativamente o desenvolvimento gestacional de fêmeas mamíferas (DOURSON et al., 1998), com efeitos deletérios sobre o peso ao nascimento dos fetos (IGRA et al., 2016). Estas constatações indicam a necessidade de se tentar mitigar a quantidade de AB utilizada nesta análise visando à redução do impacto sobre o meio ambiente e sobre a saúde. Adicionalmente, ainda no preparo da solução de destilação, utilizam-se as soluções alcólicas (1 g/L) dos indicadores vermelho de metila (VM) e verde de bromocresol (VB). As concentrações recomendadas das soluções alcólicas destes indicadores na solução de destilação são de 25 mL/L e 12 mL/L, respectivamente (DETMANN et al., 2012). De forma conjunta, a diminuição das concentrações de AB e das soluções alcólicas dos indicadores VM e VB pode acarretar redução dos custos com a análise de PB.

Portanto, objetivou-se com este trabalho avaliar se a redução das concentrações de AB e das soluções alcólicas dos indicadores VM e VB no preparo da solução de destilação usada na etapa de destilação do método de Kjeldahl compromete a quantificação de N total em diferentes materiais.

Material e Métodos

Devido à não utilização direta de animais, não houve necessidade de aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUAP-UFV) para a realização deste trabalho. Contudo, salienta-se que as amostras de origem animal utilizadas neste trabalho foram obtidas de experimentos anteriores e previamente aprovados pela CEUAP-UFV sob os protocolos n°24/2015 e n°12/2016.

Foram utilizadas 15 amostras, das quais, sete compuseram materiais de baixo teor de N (casca de soja, fezes de bovinos, silagem de milho, cana de açúcar *in natura*, fubá de milho, feno de Tifton 85 e farelo de trigo), sete compuseram materiais de alto teor de N [couro bovino, carcaça bovina, caseína de leite bovino (Sigma C7078), farelo de soja, farelo de girassol, glúten de milho e excretas de frangos de corte] e uma amostra considerada padrão analítico, cujo conteúdo de N é conhecido. A amostra tomada como padrão foi HCl-Lisina 78% (Ajinomoto Animal Nutrition, lote 003VKAF).

Todas as amostras foram obtidas em Viçosa, MG, exceto a caseína e a HCl-Lisina, as quais foram adquiridas diretamente de seus respectivos fabricantes.

As amostras com alto teor de umidade foram parcialmente secas em estufa com circulação forçada (55°C) e, em conjunto com as demais amostras, foram posteriormente submetidas à moagem em moinho de facas com peneira de porosidade 1 mm. O teor de matéria seca (MS) de todas as amostras foi obtido por intermédio do método químico de Karl Fisher (BRUTTEL e SCHLINK, 2006) utilizando-se equipamento 870 KF Titrino Plus (Metrohm).

O período experimental foi de nove dias. Cada grupo de amostras (padrão HCl-Lisina, materiais de baixo e alto teor de N) foi analisado por três dias consecutivos (três baterias de análise). Foram testadas quatro diferentes soluções de destilação em cada dia de ensaio e para cada material avaliado as quais foram constituídas pela combinação de duas concentrações de AB (40 ou 20 g/L; H₃BO₃ P.A., A.C.S., Isofar 112) e duas concentrações das soluções alcoólicas dos indicadores (25 mL/L de VM e 12 mL/L de VB ou 12,5 mL/L de VM e 6 mL/L de VB). As fontes utilizadas de VM e VB foram, respectivamente, Vetec 211 e Synth P.A. As reduções nas concentrações de AB e das soluções alcoólicas dos indicadores consistiram em 50% das quantidades atualmente recomendadas no manual Métodos para Análises de Alimentos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Ciência Animal (método INCT-CA N 001/1; DETMANN et al., 2012).

A quantificação do N contido nas amostras de cada material foi realizada por intermédio do método de Kjeldahl, conforme descrito no manual Métodos para Análises de Alimentos do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Ciência Animal (método INCT-CA N 001/1; DETMANN et al., 2012), com as seguintes modificações: utilização da relação 20:1 entre o sal sulfato de sódio (Na₂SO₄, P.A, Vetec V000121) e o catalisador metálico sulfato de cobre (CuSO₄.5 H₂O, P.A, Vetec V000118) na mistura digestora (SILVA et al., 2016); e concentração de 400 g/L de hidróxido de sódio (NaOH P.A., Vetec 1615.09) na etapa de destilação (RODRIGUES et al., 2018).

A quantidade média de material seco ao ar adicionada aos tubos para compor as alíquotas foi de 200 mg para o padrão HCl-Lisina e amostras de baixo teor de N e de 150 mg para as amostras alto teor de N. Em seguida, foram adicionados 2 g de mistura digestora e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄, grau técnico, Vetec V0T0145). Posteriormente, as alíquotas foram alocadas em blocos digestores (TE-040, Tecnal) e submetidas ao aquecimento gradativo até atingirem temperatura de aproximadamente 400°C.

O padrão analítico foi analisado em cinco repetições e dois brancos por solução de destilação, totalizando 28 alíquotas por bateria de análise. Por outro lado, as amostras foram analisadas em duas repetições para os materiais de alto e baixo N para cada solução de destilação, além de dois brancos por solução de destilação, somando-se 64 tubos por bateria de análise.

O ponto final de digestão foi definido no momento em que a solução contida nos tubos apresentou coloração verde translúcida, sem qualquer liberação de gases enegrecidos. Os tubos foram então retirados dos blocos digestores, resfriados em temperatura ambiente, e, após atingirem temperatura inferior a 100°C, adicionou-se água destilada em quantidade suficiente para dobrar o volume final da solução, procedendo-se à homogeneização manual do conteúdo dos tubos.

Logo após, as alíquotas foram destiladas em destilador de Kjeldahl (TE-036/1; Tecnal) em solução de hidróxido de sódio e aquecidas. O vapor resultante da destilação foi recolhido por arraste em 10 mL da respectiva solução de destilação até atingir o volume de 100 mL.

Posteriormente, procedeu-se à titulação em solução de ácido clorídrico (0,05 N para o padrão e materiais de alto teor de N e 0,02 N para os materiais de baixo teor de N; HCl P.A. Vetec V000154). Salienta-se que as soluções de ácido clorídrico foram previamente padronizadas utilizando-se solução

de carbonato de sódio (Na₂CO₃ anidro P.A., Isofar 349) conforme descrito no método INCT-CA N-001/1 (DETMANN et al., 2012).

Os teores de N nos diferentes materiais foram estimados utilizando-se a seguinte equação:

$$N = \frac{(V - B) \times Ne \times f \times 14 \times 1000}{A} \quad (1);$$

em que: N = teor de nitrogênio (g/kg de MS); V = volume de solução de ácido clorídrico obtido na titulação (mL); B = volume de solução de ácido clorídrico obtido na titulação do “branco” (mL); Ne = normalidade esperada da solução de ácido clorídrico; f = fator de correção da normalidade do ácido clorídrico obtido com a aferição com carbonato de sódio; e A = massa da alíquota (mg de MS).

A avaliação do padrão analítico HCl-Lisina foi realizada pela razão entre o teor de N mensurado na amostra e o teor real estabelecido por intermédio do peso atômico deste elemento em relação aos demais elementos constituintes deste aminoácido. Dessa forma, o valor calculado de N do padrão HCl-Lisina foi de 132,7 g/kg deste composto com base na MS.

As análises estatísticas para a recuperação de N do padrão HCl-Lisina foram conduzidas conforme o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + S_i + B_j + \varepsilon_{ijk} \quad (2);$$

em que: Y_{ijk} = recuperação de nitrogênio (g/g) mensurado na alíquota k, utilizando-se a solução de destilação i, na bateria de análise j; μ = constante geral; S_i = efeito da solução de destilação i (fixo); B_j = efeito da bateria de análise j (aleatório); e ε_{ijk} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ²_ε).

A partir dos resultados da análise de variância, procedeu-se à avaliação da recuperação do N oriundo do padrão por intermédio do teste t de Student, o qual foi conduzido sob as hipóteses:

$$H_0 : \mu = 1 \quad (3a);$$

$$H_a : \mu \neq 1 \quad (3b).$$

Para o caso de não rejeição da hipótese de nulidade (3a), concluiu-se que houve recuperação completa do N presente no padrão.

As análises estatísticas quanto aos teores de N para os materiais de alto e baixo teor de N foram conduzidas separadamente. O modelo utilizado foi:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + B_j + SB_{ij} + A_k + SA_{ik} + \varepsilon_{ijkl} \quad (4);$$

em que: Y_{ijkl} = teor de nitrogênio na alíquota l da amostra k na bateria de análise j utilizando-se a solução de destilação i; μ = constante geral; S_i = efeito da solução de destilação i (fixo); B_j = efeito da bateria de análise j (aleatório); SB_{ij} = efeito de interação entre solução de destilação i e bateria de análise j (aleatório); A_k = efeito da amostra k (aleatório); SA_{ik} = efeito de interação entre a solução de destilação i e amostra k (aleatório); e ε_{ijkl} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ²_ε).

Testou-se a interação entre solução de destilação e bateria para os materiais de alto e baixo teor de N e, em todos os casos, a mesma não foi significativa (P>0,05). Assim, o modelo foi reparametrizado sem a inclusão deste efeito.

Após a análise de variância procedeu-se à decomposição da soma de quadrados para solução de destilação seguindo-se esquema fatorial 2 × 2 (duas concentrações de AB e duas concentrações das soluções alcoólicas dos indicadores).

Posteriormente, uma nova bateria de análises de variância foi conduzida para os teores de N de cada tipo de material (alto ou baixo teor de N) para cada solução de destilação separadamente, segundo o modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + \varepsilon_{ijk} \quad (5);$$

em que: Y_{ijk} = teor de nitrogênio na alíquota k avaliada na amostra i na bateria de análise j ; μ = constante geral; A_i = efeito da amostra i (aleatório); B_j = efeito da bateria de análise j (aleatório); e ε_{ijk} = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0, σ^2_ε).

A partir do modelo (5), estimou-se a variância residual (variabilidade entre alíquotas) para se quantificar a repetibilidade dos teores de N para as diferentes soluções de destilação, segundo a equação:

$$r = \frac{\sqrt{\hat{\sigma}_\varepsilon^2}}{\bar{Y}} \times 100 \quad (6);$$

em que: r = repetibilidade padronizada em função da média (%); $\hat{\sigma}_\varepsilon^2$ = variância residual; e \bar{Y} = teor médio de N (g/kg de MS).

Todos os procedimentos estatísticos foram conduzidos por intermédio do procedimento MIXED do software SAS (*Statistical Analysis System*, versão 9.4), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para ocorrência do erro tipo I.

Resultados

Não foi observado efeito de bateria de análise sobre a recuperação de N do padrão HCl-Lisina ($P > 0,05$). Verificou-se recuperação completa de nitrogênio ($P > 0,05$) no padrão HCl-Lisina para todas as soluções de destilação avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1. Recuperação de nitrogênio (g/g) no padrão HCl-Lisina em função das concentrações de ácido bórico e das soluções alcoólicas dos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol na etapa de destilação do método de Kjeldahl

AB ¹ (g/L)	VM/VB ² (mL/L)	Recuperação (g/g)	Valor-P ³
40	25/12	1,002	0,763
	12,5/6	0,999	0,970
20	25/12	0,999	0,818
	12,5/6	1,001	0,883
EPM ⁴ = 0,0066			

¹ AB = Concentração de ácido bórico.

² VM/VB = Concentrações das soluções alcoólicas dos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol.

³ H₀: $\mu = 1$; H_a: $\mu \neq 1$.

⁴ EPM = Erro padrão da média.

Os teores médios de N (g/kg de MS) dos diferentes materiais avaliados em função das soluções de destilação testadas estão apresentados na Tabela 2. Não foram verificados efeitos de bateria de análise, e interação entre amostra e solução de destilação ($P > 0,05$) para os diferentes tipos de materiais (Tabela 3). Nenhum efeito foi observado com relação à variação da concentração de AB e do nível de adição das soluções alcoólicas de indicadores na solução de destilação ($P > 0,05$) sobre as concentrações de N obtidas nos diferentes materiais avaliados.

Tabela 2. Teores médios de nitrogênio (g/kg de MS) nos materiais de baixo e alto teor de nitrogênio em função das concentrações de ácido bórico e das soluções alcoólicas dos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol na etapa de destilação do método de Kjeldahl

AB ¹ (g/L)	VM/VB ² (mL/L)	Material	
		Baixo teor de nitrogênio	Alto teor de nitrogênio
40	25/12	15,6	99,5
	12,5/6	15,6	99,2
20	25/12	15,6	99,1
	12,5/6	15,7	99,3
EPM ³		3,31	16,46

¹ AB = Concentração de ácido bórico.

² VM/VB = Concentrações das soluções alcoólicas dos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol.

³ EPM = Erro padrão da média.

Não se observou nenhum tipo de padrão quanto aos valores de repetibilidade padronizada dos diferentes materiais em função das diferentes combinações entre as concentrações de AB e as relações dos indicadores alcoólicos vermelho de metila e verde de bromocresol (Figura 1). Todos os valores obtidos foram inferiores a 5%, indicando nível adequado de repetibilidade para todas as soluções de destilação avaliadas.

Discussão

A ausência de efeito de bateria de análise sobre a recuperação de nitrogênio no padrão HCl-Lisina e para as demais amostras avaliadas sob as diferentes soluções de destilação reitera aspectos de rusticidade do método de Kjeldahl, conforme verificado por outros autores (SILVA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018).

Um método dito acurado é aquele capaz de fornecer estimativas o mais próximas possível do valor real de determinado elemento ou entidade (e.g., nitrogênio), presente em um material tomado como referência, ou seja, de concentração conhecida do analito em questão (MERTENS, 2003). Portanto, o estudo da acurácia do método em meio às alterações propostas, torna-se prioritário e determinante para posteriores considerações sobre precisão e repetibilidade. Nesse sentido, a observação da recuperação completa de N a partir da HCl-lisina frente às diferentes soluções de destilação reforça que esta característica do método de Kjeldahl não foi comprometida pela redução na concentração de AB e dos diferentes indicadores.

Tabela 3. Níveis descritivos de probabilidade para ocorrência do erro tipo I em função dos diferentes efeitos avaliados sobre a concentração de nitrogênio em materiais de baixo e alto teor de nitrogênio

Efeito	Material	
	Baixo teor de nitrogênio	Alto teor de nitrogênio
AB ¹	0,950	0,857
VM/VB ²	0,558	0,940
AB × VM/VB	0,360	0,679
Amostra	0,041	0,041
Amostra × solução de destilação	0,414	- ³
Bateria	0,353	0,300

¹ AB = Concentração de ácido bórico.

² VM/VB = Concentrações das soluções alcoólicas dos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol.

³ Componente de variância igual a zero.

Adicionalmente, a ausência de interação entre amostra e soluções de destilação para os materiais de alto e baixo teor de N indica que os diferentes tipos de materiais apresentam comportamentos similares frente às diferentes soluções de destilação testadas. Tal fato demonstra que, mesmo utilizando-se as soluções de destilação contendo as menores concentrações tanto de AB (20 g/L) quanto dos indicadores VM (12 mL/L) e VB (6 mL/L), a quantidade de N mensurada não sofre alteração. Por outro lado, a ausência de efeitos associados aos fatores principais (concentrações de AB e de indicadores) reitera a ideia de que a quantidade de reagentes utilizada nas diferentes etapas do método de Kjeldahl tem sido acima do necessário, demonstrando a necessidade de estudos objetivando maior eficiência de utilização dos mesmos, conforme observado também em outros trabalhos (SILVA et al., 2016; RODRIGUES et al., 2017).

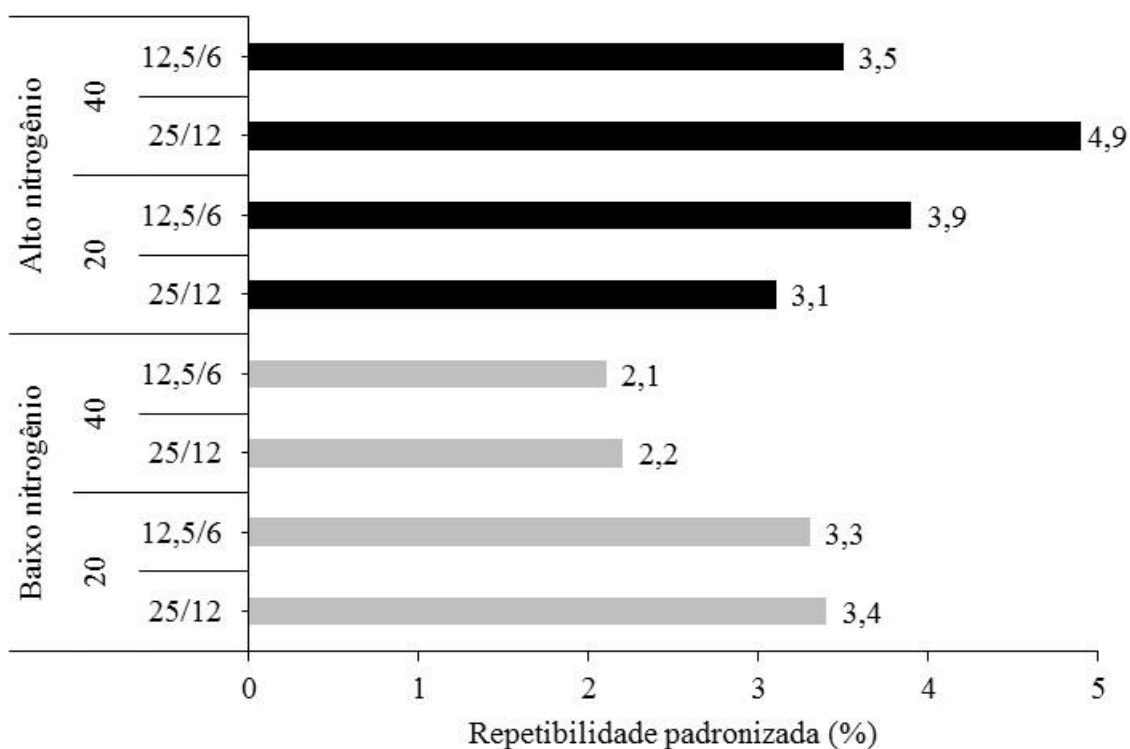


Figura 1: Repetibilidade padronizada em função da média para os materiais de alto e baixo nitrogênio em função da concentração de ácido bórico (AB; g/L) e concentrações das soluções alcoólicas dos indicadores vermelho de metila e verde de bromocresol (VM/VB; mL/L) na solução de destilação.

Embora a literatura concernente à análise de alimentos não apresente valores de repetibilidade tomados como referência, os valores obtidos diante às diferentes combinações podem ser considerados baixos.

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se inferir que a escolha da solução de destilação para utilização nas rotinas de análises de N pelo método de Kjeldahl fica a critério do analista. No entanto, considerando-se que um método prático deve levar em consideração aspectos econômicos (MERTENS, 2003), aliado à preocupação em se reduzir a geração de resíduos potencialmente prejudiciais ao meio ambiente e à saúde humana (ETHERIDGE et al., 1998; DETMANN et al., 2014), a solução que inclui menores concentrações tanto de AB (20 g/L) quanto das soluções alcoólicas dos indicadores VM (12 mL/L) e VB (6 mL/L) deve ser recomendada.

Conclusão

A redução de concentração dos reagentes utilizada na solução de destilação do método Kjeldahl não afeta a quantificação total de N em diferentes amostras. Além disso, tais mudanças podem contribuir significativamente para reduzir os custos de análise, o impacto substancial ao meio ambiente e à saúde humana. Nesse sentido, recomenda-se solução de destilação com concentração de ácido bórico de 20 g/L com a adição de 12 mL/L e 6 mL/L das soluções alcoólicas (1 g/L) de vermelho de metila e verde de bromocresol, respectivamente.

Agradecimentos

Ao INCT Ciência Animal, ao CNPq, à CAPES e à FAPEMIG por proverem recursos para a realização deste trabalho.

Referências bibliográficas

- BRUTTEL, P.; SCHLINK, R. Water determination by Karl Fisher titration. Herisau: Metrohm, 2006. 80p.
- CHANG, S.K.C. Protein analysis. In: NIELSEN S.S. (Ed.) **Food analysis**. 2ª ed. West Lafayette: Aspen Publishers, 1998, p.237-250.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M.; AZEVEDO, J.A.G. **Métodos para análise de alimentos**. Suprema: Visconde do Rio Branco, 2012. 214p.
- DETMANN, E.; FERREIRA, A.S.; SCOTTÁ, B.A. Métodos para avaliar a qualidade proteica dos alimentos. In: SAKOMURA, N.K.; SILVA, J.H.V.; COSTA, F.G.P.; FERNANDES, J.B.K.; HAUSCHILD, L. (Eds.). **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2014. p. 537-554.
- DOURSON, M.; MAIER, A.; MEEK, B.; RENWICK, A.; OHANIAN, E.; POIRIER, K. Boron tolerable intake: re-evaluation of toxicokinetics for data-derived uncertainty factors. **Biological Trace Element Research**, v.66, p.453-463, 1998.
- ETHERIDGE, R.D.; PESTI, G.M.; FOSTER, E.H. A comparison of nitrogen values obtained utilizing the Kjeldahl nitrogen and Dumas combustion methodologies (Leco CNS 2000) on samples typical of an animal nutrition laboratory. **Animal Feed Science and Technology**, v.73, p.21-28, 1998.

IGRA, A.M.; HARARI, F.; LU, Y.; CASIMIRO, E.; VAHTER, M. Boron exposure through drinking water during pregnancy and birth size. **Environment International**, v.95, p.54-60, 2016.

MERTENS, D. R. Challenges in measuring insoluble dietary fiber. **Journal of Animal Science**, v. 81, p.3233-3249, 2003.

POMERANZ, Y.; MELOAN, C.E. **Food analysis: theory and practice**. Westport: AVI, 1978. 710p.

RODRIGUES, A.N; SILVA, T.E.; DETMANN, E. Concentrações de hidróxido de sódio nas soluções de destilação do método de kjeldahl sobre a quantificação do nitrogênio total. **Boletim de Indústria Animal**, v.75, p.9-16, 2018.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos. Métodos químicos e biológicos**. 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 235p.

SILVA, T.E.; DETMANN, E.; FRANCO, M.O.; PALMA, M.N.; ROCHA, G.C. Evaluation of digestion procedures in Kjeldahl method to quantify total nitrogen in analyses applied to animal nutrition. **Acta Scientiarum - Animal Sciences**, v.38, p.45-51, 2016.

Recebido em 30 de abril de 2019

Aceito em 04 de maio de 2019