



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
QMC5515 – Estágio Supervisionado

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO DESENVOLVIDO NA
SEÇÃO LABORATORIAL AVANÇADA DE SANTA CATARINA DO
LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA**

GREGORI BARP

**ORIENTADOR: Dr. LUCIANO VITALI
SUPERVISOR: Dr. HEITOR DAGUER**

FLORIANÓPOLIS – SC
NOVEMBRO/2020

Gregori Barp

**AVALIAR A POSSIBILIDADE DE REDUÇÃO DO TEMPO DA ETAPA DE
DESTILAÇÃO DO MÉTODO KJELDAHL PARA DETERMINAÇÃO DE
PROTEÍNA BRUTA EM ALIMENTOS E RAÇÕES**

Projeto de Estágio Supervisionado (QMC-5515) apresentado ao Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina desenvolvido na Seção Laboratorial Avançada – SLAV – São José pertencente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Química Tecnológica.

Orientador: Prof. Dr. Luciano Vitali

Supervisor: Dr. Heitor Daguer.

FLORIANÓPOLIS – SC
NOVEMBRO/2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelas oportunidades recebidas, sabedoria e dom da vida.

Em especial agradeço aos meus pais Ademir Hilário Barp e Ana Lorena Prado Barp, principalmente a minha mãe pelo apoio financeiro, dedicação, exemplo de caráter, ao meu irmão Murilo Augusto Barp por ter contribuído diretamente com seus recursos para a realização deste sonho e a minha esposa Fernanda Peretti Barp, quero agradecer por ter me aguentado no decorrer da realização deste sonho, pelo seu cuidado, zelo, apoio e compreensão.

Agradeço a oportunidade concedida pelo Dr. Heitor Daguer em poder estagiar no MAPA, oportunidade essa de grande valia, principalmente na formação profissional, sem contar a todos os membros da SLAV-SC.

Ao professor Dr. Luciano Vitali por ser meu orientador, dedicando seu tempo disponível para realização deste trabalho.

Agradecimento a Hernan Dario Alzate Sepulveda por ter disponibilizado matérias didáticos na construção deste trabalho e ao colega de curso Lucas Palmas Mattos por estar ao lado dando forças e ajudando com seu tempo disponível.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Departamento de Química da UFSC por todo o suporte oferecido.

RESUMO

A determinação de proteína utilizando a técnica volumétrica desenvolvida por Kjeldahl é uma das mais usadas no mundo. É um método confiável para análise de nitrogênio que facilita os laboratórios acreditados pela norma ISO 17025 quanto à garantia da qualidade dos dados gerados. Milhares de medidas de proteínas são geradas diariamente para fiscalização e monitoramento nos laboratórios para avaliação da conformidade técnica dos alimentos, garantindo seu valor nutricional e evitando fraudes. A diminuição do tempo de análise é necessária para o aumento da frequência analítica de um laboratório de rotina. Por conta disso, este trabalho visou a diminuição do tempo de destilação do método Kjeldahl para análise de proteína em alimentos, garantindo a confiabilidade dos dados gerados. Essa análise faz parte do escopo de métodos da Seção Laboratorial Avançada de Santa Catarina, pertencente ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, um dos laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. A realização deste trabalho durante o estágio possibilitou uma experiência única de aprendizado profissional na formação para conclusão do curso de Bacharelado em Química Tecnológica.

Palavras-chave: análise de alimentos, método Kjeldahl, volumetria, nitrogênio, proteína.

Lista de abreviaturas e siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

CGAL – Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários

DTEC – Departamento de Serviços Técnicos

ISO- Organização Internacional para Padronização (tradução do inglês)

LFDA – Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NBR – Norma Brasileira

SDA – Secretaria de Defesa Agropecuária

Lista de tabelas

Tabela 1: Reagentes.....	15
Tabela 2: Padrões.....	15
Tabela 3: Percentual de nitrogênio de acordo com o grau de pureza do sulfato de amônio para avaliação da recuperação na determinação de proteína bruta.....	18
Tabela 4: Rampa de aquecimento para digestão de amostras na determinação de proteína bruta (método micro-Kjeldahl)	19
Tabela 5: Fatores empíricos de conversão de nitrogênio em proteína bruta de amostras de alimentos de origem animal, alimentos para animais e ingredientes para rações.....	21
Tabela 6: Teste de performance da etapa de destilação.....	22
Tabela 7: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	23
Tabela 8: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	23
Tabela 9: Teste de performance da etapa de digestão.....	24
Tabela 10: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	25
Tabela 11: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.....	25
Tabela 12: Percentual de proteína bruta.....	26

Lista de figuras

Figura 1: Digestor.....	19
Figura 2: Destilador.....	20
Figura 3: Antes da titulação.....	21
Figura 4: Após titulação, pH próximo de 3,8.....	21

SUMÁRIO

RESUMO	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
Lista de tabelas	vi
Lista de figuras	vii
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE TRABALHO.....	11
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
3.1. Método Kjeldahl.....	12
3.2. Determinação de proteína bruta em alimentos e rações por acidimetria.....	12
4. OBJETIVOS.....	14
4.1. Objetivo geral.....	14
4.2. Objetivos Específicos	14
5. METODOLOGIA.....	15
5.1. Reagentes.....	15
5.1.1. Reagentes.....	15
5.2. Equipamentos.....	15
5.3. Preparo das soluções na determinação de proteína bruta por acidimetria.....	16
5.4. Teste inicial usando amostra padrão de sulfato de amônio.....	16
5.5. Determinação de proteína bruta em alimentos e rações por acidimetria.....	18
5.5.1. Digestão micro Kjeldahl.....	18
5.5.1.1. <u>Teste de performance do procedimento de digestão</u>.....	19
5.5.2. Destilação e Titulação.....	20
6.DISSCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO.....	22

6.1. Teste de performance do procedimento de destilação.....	22
6.2. Digestão, destilação e titulação da amostra certificada de ração.	24
6.2.1. Teste de performance do procedimento de digestão.....	24
6.2.2. Determinação de proteína bruta.....	26
7.CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS.....	28
8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL....	29
9. REFERÊNCIAS.....	30
10. ANEXOS.....	32

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos tem-se visto uma corrida na obtenção de maior grau de satisfação referente à qualidade dos alimentos, a qual requer garantias de melhor controle de processos industriais. Nesse cenário, é de fundamental importância a atuação do químico tecnológico em paralelo, assegurando as boas práticas de fabricação dos processos industriais.

A confiabilidade dos produtos é atestada pelos laboratórios acreditados pelo INMETRO na normativa ABNT NBR ISO/IEC 17025 que são os requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.

O presente trabalho foi realizado em um dos laboratórios acreditados pelo INMETRO para execução dessa norma, situado na Seção Laboratorial Avançada localizada em São José – SLAV – SC, pertencente ao Laboratório Federal de Defesa Agropecuária – (LFDA/RS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA.

De todos os setores do laboratório e métodos analíticos acompanhados durante o estágio, no presente relatório o foco será a determinação de proteína bruta em alimentos e rações pelo método Kjeldahl. Isso decorreu da demanda do laboratório por avaliar a possibilidade de uma melhora desse método diminuindo o tempo de análise em uma de suas etapas, sem que ocorressem perdas na confiabilidade dos dados gerados. A resultante seria o aumento da capacidade desse tipo de análise pelo laboratório, o que pode ser bem interessante, uma vez que no controle de qualidade muitas amostras precisam ser analisadas diariamente.

2. APRESENTAÇÃO DO LOCAL DE TRABALHO

Os LFDA são unidades laboratoriais descentralizadas do MAPA, sendo coordenados pela CGAL, DTEC e subordinados à SDA/MAPA. OS LFDA têm como política de qualidade a busca pela conformidade dos ensaios realizados em relação aos requisitos da ABNT NBR ISO/IEC 17025, trabalhando em consonância com a missão do MAPA (promover o desenvolvimento sustentável da agropecuária e a segurança e competitividade de seus produtos), sua visão (ser referência mundial em seus serviços laboratoriais agropecuários) e objetivo (ser reconhecido como referência e excelência na prestação de serviços laboratoriais para defesa agropecuária). Os LFDA possuem como competência realizar análises oficiais, fazer o monitoramento de fiscalizações e auditorias em laboratórios da rede nacional e promover o suporte técnico-científico e laboratorial às atividades de fiscalização, programas e controles oficiais.

LFDA e SLAVs estão localizados em todas as regiões do Brasil: região Norte, LFDA Belém – PA; região Nordeste, LFDA Recife – PE; região Centro-Oeste, LFDA Goiânia – GO com SLAV em Campo Grande – MS; região Sudeste, LFDA Pedro Leopoldo – MG com SLAV em Uberlândia e Belo Horizonte, LFDA Campinas – SP com SLAV em Jundiaí - SP; região Sul, LFDA Porto Alegre – RS com SLAV em São José – SC, sendo esse último local onde foram realizados os trabalhos do estágio.

A SLAV de São José – SC recebe amostras tais como: pescados para análise de biotoxinas, sódio e potássio, produtos lácteos, produtos cárneos como frango e embutidos para determinação de proteínas, provenientes de todas as regiões do Brasil. O laboratório está equipado com instrumentos de análises de alta tecnologia, assegurando confiabilidade dos dados. Além disso, o laboratório emprega métodos de referência em suas análises.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Proteínas

Proteínas são essenciais para todas as células vivas. Estão presentes em diversos tipos de alimentos, em maior ou menor quantidade, sendo constituídas de carbono, 50 – 55%; hidrogênio, 6 – 8%; oxigênio, 20 – 24%; nitrogênio, 15 – 18% e enxofre, 0,2 – 0,3%. São fundamentais para as funções fisiológicas dos organismos vivos.¹

As proteínas alimentares consumidas com moderação são facilmente digeridas e não possuem toxicidade. A determinação de proteínas pode ser feita pela quantificação do nitrogênio encontrado presente nos alimentos, sendo que o método Kjeldahl é o mais utilizado.^{2,3}

3.2. Método Kjeldahl

O método de determinação de nitrogênio total foi desenvolvido em 1883 por Johan Gustav Christoffer Thorsager Kjeldahl. É o método analítico mais utilizado com esse fim, empregando um procedimento de oxidação da amostra por via úmida. São encontrados também outros métodos e técnicas analíticas para a determinação de nitrogênio, tais como Dumas (que consiste de oxidação por via seca e o método do formol, baseado em uma titulação ácido-base.^{4,5}

O procedimento Kjeldahl consiste em digestão com ácido sulfúrico concentrado e catalisador para acelerar a reação, seguida de destilação a quente com hidróxido de sódio para liberação da amônia, que é retida em excesso de ácido bórico. Em seguida, uma titulação com ácido padronizado é feita para determinar o nitrogênio presente na amostra.⁶

Apesar de clássico, esse método ainda é referência no mundo quando se trata de determinação de proteínas em alimentos, sendo recomendado por vários órgãos normalizadores como a AOAC e a ISO.

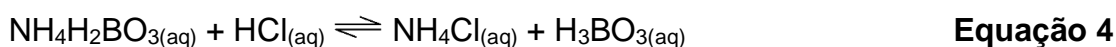
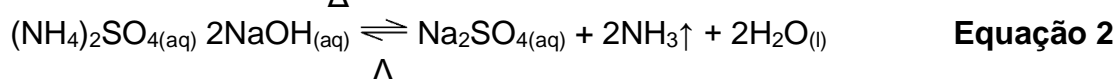
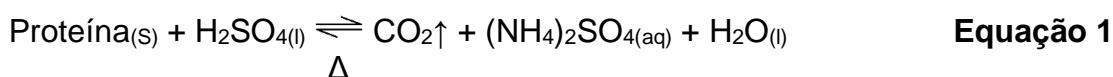
3.3. Determinação de proteína bruta em alimentos e rações por acidimetria

A determinação de proteína em alimentos é dividida em etapas, como é mostrado no **esquema 1**.



Esquema 1: Divisão das etapas do método de determinação de proteína.

O método de Kjeldahl baseia-se na digestão das proteínas e outros compostos nitrogenados com ácido sulfúrico concentrado, fraco agente oxidante da matéria orgânica, oxidando o carbono e hidrogênio da proteína formando dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O). O nitrogênio é reduzido, formando o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), conforme **Equação 1**. Em seguida o sulfato de amônio é destilado na presença da solução concentrada de hidróxido de sódio, objetivando transformar o íon amônio (NH_4^+) presente no $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em amônia gasosa ($\text{NH}_3\uparrow$), que reage com o ácido bórico (H_3BO_3), formando o borato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$), **Equação 2 e 3**, e finalmente titulada com ácido clorídrico de concentração conhecida (**Equação 4**), onde quanto maior o volume gasto do titulante, por titulação de retorno, maior a quantidade de nitrogênio presente na amostra.^{7,8,9}



A etapa digestão das amostras é essencial na degradação da matéria orgânica presente na mesma, e por mais longa que seja esta etapa, se faz necessário esse tempo mais longo. A destilação é a segunda etapa mais longa do método, com tempo de análise de seis minutos por amostra, seguida de titulação que geralmente é feita em curto tempo. Assim, o estudo realizado avaliou a variação do tempo de destilação, visando à sua redução, sem comprometer a garantia da qualidade dos dados obtidos, fator importante de ser melhorado em um método para aumentar sua frequência analítica.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Avaliar a possibilidade de redução do tempo da etapa de destilação do método Kjeldahl para determinação de proteína bruta em alimentos e rações.

4.2. Objetivos Específicos

- Realizar o método Kjeldahl variando o tempo na etapa de destilação de 2 a 6 minutos para uma amostra de sulfato de amônio,
- Comparar os resultados de concentração de nitrogênio obtidos nos diferentes tempos de destilação usando testes estatísticos,
- Realizar o método Kjeldahl variando o tempo de destilação de 2 a 6 minutos para uma amostra certificada,
- Comparar os resultados de proteína bruta obtidos nos diferentes tempos de destilação usando teste estatístico, obtidos com o método convencional após variação nos tempos de destilação,
- Com base nos resultados obtidos, indicar a viabilidade de diminuição no tempo de destilação do método Kjeldahl.

5. METODOLOGIA

5.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada ou ultra pura.

5.1.1. Reagentes

As **Tabelas 1 e 2** mostram todos os reagentes e padrões utilizados na determinação de proteína.

Tabela 1: Reagentes

Descrição	Fórmula Molecular
Ácido bórico	H_3BO_3
Ácido clorídrico	HCl
Ácido sulfúrico	H_2SO_4
Hidróxido de sódio	NaOH
Sulfato de cobre penta hidratado	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$
Sulfato de sódio	Na_2SO_4
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$

Tabela 2: Padrões

Descrição	Fórmula Molecular
Carbonato de sódio	Na_2CO_3
Sulfato de amônio	$(NH_4)_2SO_4$
L-triptofano	$C_{11}H_{12}N_2O_2$

5.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados para este trabalho foram: balança analítica (marca Bioprecisa), bloco digestor (marca Gerhardt), titulador automático (marca Schott), destilador micro-Kjeldahl (marca Gerhardt) e forno mufla (marca Jung).

5.3. Preparo das soluções na determinação de proteína bruta por acidimetria

- Mistura catalítica:

Foram trituradas dez partes de sulfato de sódio anidro e uma parte de sulfato de cobre penta hidratado, em seguida foram homogeneizados e armazenados em frasco identificado.

- Solução de hidróxido de sódio 32% (m/v):

Em um béquer mantido em banho de gelo, foram dissolvidos 320 g de hidróxido de sódio em cerca de 800 mL de água deionizada. Após resfriamento da solução, a mesma foi transferida para um balão volumétrico de 1000 mL e avolumado.

- Solução de ácido bórico 4% (m/v):

Foram dissolvidos 40 g de ácido bórico em béquer contendo 800 mL de água deionizada sob aquecimento. A mistura foi homogeneizada e, em seguida foi resfriada, transferida para balão volumétrico de 1000 mL e avolumada.

- Solução ácido clorídrico 0,1 molL⁻¹:

Lentamente foram transferidos 8,35 mL de ácido clorídrico para balão volumétrico de 1000 mL contendo 10 mL de água deionizada, em seguida a mistura foi avolumada e estocada em frasco de vidro.

- Amostra certificada de sulfato de amônio 99%, esperado 20,98% de nitrogênio ((NH₄)₂SO₄).

- Amostra certificada de L-triptofano, esperado 13,72% de nitrogênio (C₁₁H₁₂N₂O₂).

5.4. Teste inicial usando amostra padrão de sulfato de amônio

Primeiramente foi realizado um teste de performance da etapa de destilação utilizando nove tubos contendo aproximadamente 0,15 g de amostra padrão de sulfato de amônio 99%, seco em estufa a 102 °C por duas horas, com adição de 5 mL de solução hidróxido de sódio 32% em cada tubo.

Após destilação com 30 mL de NaOH e 20 mL de H₂O, o destilado foi recolhido em béquer de 250 mL contendo 50 mL de solução ácido bórico 4%, variando o tempo de destilação de 2, 4 e 6 minutos para cada amostra, seguido

de titulação com solução de HCl 0,1 molL⁻¹. O percentual de nitrogênio recuperado foi determinado conforme **Equação 5** e **Equação 7**, comparando os valores obtidos para cada tempo selecionado. As medidas realizadas em cada tempo foram obtidas em triplicata.

$$\% Nr = \frac{(V-B) \cdot CT \cdot FC \cdot 1,4007}{m} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: % Nr = percentual de nitrogênio recolhido; V = volume gasto de titulante (mL); B = volume do branco (mL); CT = concentração teórica da solução titulante (molL⁻¹); FC = fator de correção da solução titulante; m = massa de amostra (g).

O FC foi calculado conforme **Equação 6**.

$$FC = \frac{m}{0,053 \cdot V \cdot CT} \quad \text{Equação 6}$$

Onde: m = massa de carbonato de sódio (g); V = volume gasto de titulante (mL); CT = concentração teórica da solução titulante (molL⁻¹)

$$\% Nrec = \frac{\% Nr}{\% N} \cdot 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde: %Nrec = percentual de nitrogênio recuperado; % Nr = percentual de nitrogênio recolhido; %N = percentual de nitrogênio de acordo com o grau de pureza do sulfato de amônio, conforme **Tabela 3**.

O ponto final da titulação ou ponto de viragem foi verificado mediante utilização de pHmetro. Como o destilado é recolhido em ácido bórico (**Equação 3**), após titulação do amônio, a solução de ácido bórico é recuperada (**Equação 4**), mostrando uma titulação de retorno. O ponto final da titulação deve ter o mesmo pH da solução original de ácido bórico 4%, pH em torno de 3,8.

Tabela 3: Percentual de nitrogênio de acordo com o grau de pureza do sulfato de amônio para avaliação da recuperação na determinação de proteína bruta.

GRAU DE PUREZA	PERCENTUAL DE NITROGÊNIO
99,0%	20,98%
99,1%	21,00%
99,2%	21,02%
99,3%	21,04%
99,4%	21,06%
99,5%	21,09%
99,6%	21,12%
99,7%	21,14%

5.5. Determinação de proteína bruta em alimentos e rações por acidimetria

A determinação de proteína bruta em alimentos e rações seguiu a ISO 1871: Alimentos e alimentos para animais - Diretrizes gerais para a determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl.¹⁰

Todas as amostras para a determinação de proteína foram preparadas e quantificadas em triplicata.

5.5.1. Digestão micro Kjeldahl

Em nove tubos pesaram-se aproximadamente 0,25 g de amostra certificada de ração com concentração conhecida de nitrogênio. Foram adicionados 5 g de mistura catalítica e 10 mL de ácido sulfúrico concentrado, deixados em bloco digestor, (**Figura 1**), até a mistura reacional se tornar límpida e transparente conforme a programação mostrada na **Tabela 4**.



Figura 1: Digestor

Tabela 4: Programa de aquecimento para digestão de amostras na determinação de proteína bruta (método micro-Kjeldahl)

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (min)
1	50	60
2	100	60
3	150	30
4	200	30
5	250	30
6	300	30
7	380 a 420	Até digestão completa

Foi utilizada amostra de ração certificada com concentração conhecida de nitrogênio para avaliar a etapa de digestão para validação do método na determinação de proteína.

5.5.1.1. Teste de performance do procedimento de digestão

O teste foi realizado com material de referência para calcular a massa de nitrogênio recuperado, substituindo a amostra certificada de ração por 0,08 g de L-triptofano, 0,34 g de sacarose e ácido sulfúrico, que foram adicionados ao tudo digestor e mantidos em repouso antes da digestão.

Ao final, foi calculada a fração de massa de nitrogênio recuperado após o procedimento de destilação seguido de titulação, calculado através da **Equação 5** e **Equação 8**.

$$\% N_{rec} = \frac{\% N_r}{\% N} \cdot 100 \quad \text{Equação 8}$$

Onde: $\% N_{rec}$ = percentual de nitrogênio recuperado; $\% N_r$ = percentual de nitrogênio recolhido; $\% N$ = percentual de nitrogênio de acordo com o grau de pureza do L-triptofano.

5.5.2. Destilação e Titulação

Terminada a etapa de digestão, tanto a amostra certificada de ração quanto o teste de performance do procedimento de digestão (itens **5.5.1** e **5.5.1.1**) foram submetidos à etapa de destilação, (**Figura 2**), variando o tempo de 2, 4 e 6 minutos, juntamente com o teste de performance do procedimento de destilação (item **5.4**), seguido de titulação, como é visto nas **Figuras 1** e **2**, com solução de HCl $0,1 \text{ molL}^{-1}$. O percentual de nitrogênio recuperado foi determinado conforme **Equação 5** e **Equação 8** comparando os valores obtidos de nitrogênio para cada tempo selecionado, onde o cálculo de proteína bruta foi realizado conforme **Equação 9**.

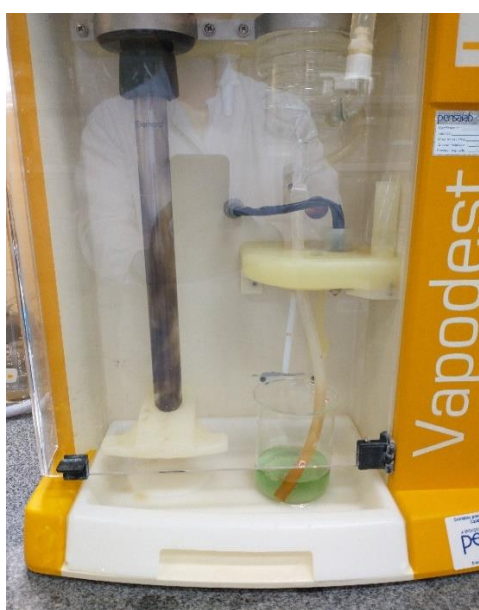


Figura 2: Destilador

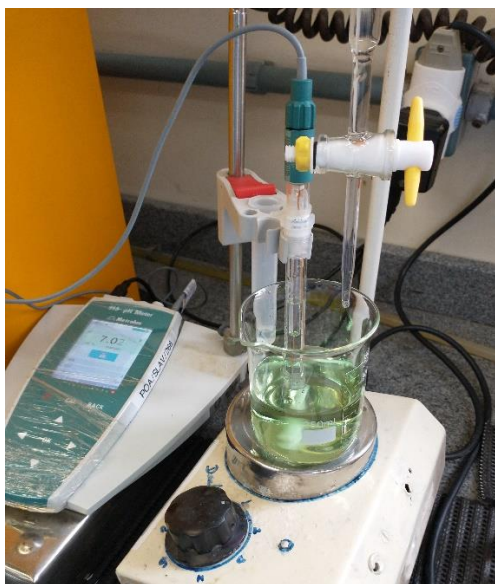


Figura 3: Antes da titulação.

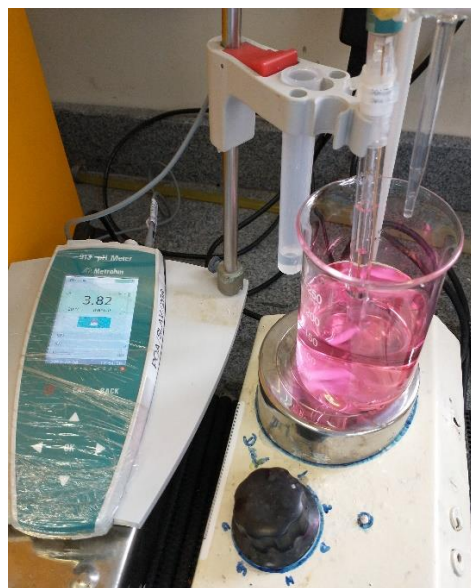


Figura 4: Após titulação, pH próximo de 3,8.

$$PB = \%Nr \cdot FE$$

Equação 9.

Onde: PB = proteína bruta ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$); %Nr = percentual de nitrogênio recuperado; FE = fator empírico de conversão de nitrogênio em proteína bruta (Tabela 5).

Tabela 5: Fatores empíricos de conversão de nitrogênio em proteína bruta de amostras de alimentos de origem animal, alimentos para animais e ingredientes para rações.

Matrizes	Fator empírico (FE)
Gelatina	5,55
Aveia, cevada, trigo e derivados	5,83
Arroz	5,95
Alimentos em geral (exceto lácteos), inclusive carnes, pescados e derivados; alimentos para animais; subprodutos de origem animal (exceto lácteos); soja	6,25
Leite e derivados	6,38
Gema de ovo	6,62
Clara de ovo	6,67

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS NO ESTÁGIO

6.1. Teste de performance do procedimento de destilação

O teste de performance da etapa de destilação variando o tempo de destilação utilizando amostra padrão de sulfato de amônio foi primordial para validação do método na determinação de nitrogênio e posterior quantificação de proteína em amostra certificada de ração. Os valores obtidos de nitrogênio em amostra padrão de sulfato de amônio, mesmo variando o tempo de destilação, foram próximos do percentual de nitrogênio esperado (valor de referência = 20,98%) como mostra a **Tabela 3**.

Os percentuais de nitrogênio recuperado nos testes do processo de destilação variando o tempo de 2, 4 e 6 minutos seguido de titulação com solução ácido clorídrico $0,1 \text{ molL}^{-1}$, estão apresentados na **Tabela 6**.

Tabela 6: Teste de performance da etapa de destilação

Réplica	% Nitrogênio Tempo 6 (min)	% Nitrogênio Tempo 4 (min)	% Nitrogênio Tempo 2 (min)
1	20,68	20,80	20,31
2	20,82	20,87	21,22
3	20,85	20,85	21,01
4	20,77	20,52	20,70
5	20,62	20,59	20,65
6	20,63	20,51	20,47
7	20,72	20,63	20,65
8	20,67	20,45	
9	20,44		
Média % Nitrogênio recuperado 6 =			98,61
Média % Nitrogênio recuperado 4 =			98,44
Média % Nitrogênio recuperado 2 =			98,74

Os testes estatísticos aplicados para os resultados do teste de performance da etapa de destilação comparando os tempos do método convencional (6 minutos) com os tempos de 4 e 2 minutos estão apresentados nas **Tabelas 7 e 8**, respectivamente.

Tabela 7: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 6 (min)</i>	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 4 (min)</i>
Média	20,69	20,65
Variância	0,02	0,03
Observações	9	8
Variância agrupada	0,02	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	15	
Stat t	0,519	
P(T<=t) bi-caudal	0,612	
t crítico bi-caudal	2,131	

Tabela 8: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 6 (min)</i>	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 2 (min)</i>
Média	20,69	20,72
Variância	0,02	0,10
Observações	9	7
Variância agrupada	0,050	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	14	
Stat t	-0,239	
P(T<=t) bi-caudal	0,815	
t crítico bi-caudal	2,145	

Comparando os tempos de destilação e considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), o teste indica que os dados mostram evidências suficientes de que H_0 é verdadeira pois, p – teste bicaudal para comparação do tempo de seis e quatro minutos de destilação = 0,612 e p – teste bicaudal para comparação do tempo de seis e dois minutos de destilação = 0,815, portanto, maior que o nível de significância adotado.

Desta forma é notório que os dados não apresentam diferenças, assumindo-se que a hipótese nula (H_0) seja verdadeira. Assim os resultados indicam que é possível diminuir o tempo de destilação para quatro ou dois minutos com amostra padrão de sulfato de amônio.

6.2. Digestão, destilação e titulação da amostra certificada de ração.

Após a digestão das amostras, e teste positivo da etapa de destilação com amostra padrão de sulfato de amônio, foi realizado o teste de performance da etapa de digestão com amostra padrão de L-triptofano.

6.2.1. Teste de performance do procedimento de digestão

Essa etapa teve por objetivo garantir a qualidade das medições antes da quantificação das amostras de ração. Caso o teor de nitrogênio recuperado estiver dentro do valor aceitável para amostra padrão de L-triptofano, seguirá o processo de destilação seguido de titulação para todas as amostras. Caso o teor de nitrogênio recuperado para amostra padrão de L-triptofano estiver fora do valor aceitável, sendo de 13,72% em razão mássica (valor de referência), deve ser realizada toda a etapa de digestão descritas nos itens **5.5.1** e **5.5.1.1**.

Os resultados obtidos de percentual de nitrogênio recuperado utilizando amostra padrão de triptofano são mostrados na **Tabela 9**.

Tabela 9: Teste de performance da etapa de digestão

Réplica	% Nitrogênio Tempo 6 (min)	% Nitrogênio Tempo 4 (min)	% Nitrogênio Tempo 2 (min)
1	13,64	13,50	13,43
2	13,43	13,52	13,47
3	13,27	13,46	13,45
Média % Nitrogênio recuperado 6 =			98,01
Média % Nitrogênio recuperado 4 =			98,35
Média % Nitrogênio recuperado 2 =			98,03

O percentual de nitrogênio recuperado conforme **equação 8**, para tempo de 6, 4 e 2 minutos de destilação seguido de titulação com solução ácido clorídrico 0,1 molL⁻¹ respectivamente foi de 98,01%, 98,35% e 98,03%, estando dentro do valor aceitável, em torno de 98 a 101 % de recuperação.

Os testes estatísticos aplicados para os resultados do teste de performance da etapa de digestão comparando o tempo do método convencional

(6 minutos) com os tempos de 4 e 2 minutos estão apresentados nas **Tabelas 10 e 11**, respectivamente.

Tabela 10: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 6 (min)</i>	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 4 (min)</i>
Média	13,447	13,493
Variância	0,034	0,0009
Observações	3	3
Variância agrupada	0,018	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-0,430	
P(T<=t) bi-caudal	0,689	
t crítico bi-caudal	2,776	

Tabela 11: Teste-t: duas amostras presumindo variâncias equivalentes.

	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 6 (min)</i>	<i>% Nitrogênio recolhido Tempo 2 (min)</i>
Média	13,447	13,450
Variância	0,034	0,0004
Observações	3	3
Variância agrupada	0,017	
Hipótese da diferença de média	0	
gl	4	
Stat t	-0,031	
P(T<=t) bi-caudal	0,977	
t crítico bi-caudal	2,776	

Comparando os tempos de digestão e considerando o nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), o teste conclui que os dados mostram evidências suficientes de que H_0 é verdadeira pois, p – teste bicaudal para comparação do tempo de seis e quatro minutos de destilação = 0,689 e p – teste bicaudal para comparação do tempo de seis e dois minutos de destilação = 0,977, portanto, maior que o nível de significância adotado.

Assim, é possível dizer que os dados não apresentam diferenças, assumindo que a hipótese nula (H_0) é verdadeira, mostrando possível a sequência de determinação de proteína bruta em amostra certificada de ração.

6.2.2. Determinação de proteína bruta

Os testes de performance tanto da etapa de digestão como destilação, permitem avaliar os valores obtidos de nitrogênio para cada amostra padrão tanto de L-triptofano como sulfato de amônio, possibilitando ou não a continuidade na determinação de proteína para amostra certificada de ração.

Com resultado positivo nos testes de performance da etapa de digestão e destilação, seguiu-se a quantificação de proteína bruta em amostra certificada de ração.

O percentual de proteína bruta na amostra certificada de ração é de 19,04% com desvio padrão de 0,3845, e os resultados obtidos de proteína bruta são mostrados na **Tabela 12**.

Tabela 12: Percentual de proteína bruta.

% Nitrogênio recolhido Tempo 6 (min)	% Nitrogênio recolhido Tempo 4 (min)	% Nitrogênio recolhido Tempo 2 (min)
18,59	18,60	17,84
18,41	18,45	18,37
18,91	18,87	18,06
Média % Nitrogênio 6 =	18,62	
Média % Nitrogênio 4 =	18,64	
Média % Nitrogênio 2 =	18,10	
Z-score 6 =	1,049	
Z-score 4 =	1,040	
Z-score 2 =	2,471	

O percentual de proteína bruta para cada tempo de destilação foi calculado conforme **equação 9**, e o fator empírico de conversão de nitrogênio, **tabela 5**, é de 6,25, sendo que a validação dos resultados foi realizada por meio de teste estatístico Z-score.

Os Z-scores obtidos mostram que o percentual de proteína bruta para os tempos de 4 e 6 minutos de destilação são aceitáveis, estando entre -2 e 2. Para o tempo de 2 minutos de destilação o resultado é questionável, estando nas faixas de -2 a -3 e 2 a 3.

Os resultados sugerem que é possível reduzir o tempo de destilação para 4 minutos, assim, se em média é destilado 20 amostras por dia e cada amostra exige no método convencional 6 minutos de destilação, totalizando 2 horas de destilação, com a possibilidade de redução no tempo para 4 minutos é possível realizar no mesmo tempo de 2 horas de destilação, um total de 30 amostras, aumentando a frequência analítica.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

O teste de performance da etapa de destilação variando o tempo de destilação utilizando amostra padrão de sulfato de amônio foi primordial para a realização do experimento, obtendo percentual de nitrogênio recuperado para cada tempo de destilação próximo a 99%, estando de acordo com o valor aceitável (99 a 101 % de recuperação).

Os resultados obtidos no teste de performance da etapa de digestão com amostra padrão de L-triptofano após destilação seguido de titulação com solução HCl $0,1\text{molL}^{-1}$, foram superiores a 98%, estando dentro do valor aceitável (98 a 101 % de recuperação). Desta forma foi possível dar continuidade na quantificação do teor de proteína bruta na amostra certificada de ração após resultados positivos nos testes de performance.

Os resultados da comparação dos tempos de destilação seguido de titulação não apresentaram diferenças significativas entre eles. Dessa forma, a diminuição do tempo de destilação não afeta o percentual de nitrogênio recuperado para as amostras padrão de sulfato de amônio e L-triptofano na etapa de destilação.

Os resultados obtidos de proteína bruta na amostra certificada de ração, obtiveram valores aceitáveis para o tempo de seis minutos de destilação, já utilizado pelo método, e também para quatro minutos de destilação, sendo questionável para o tempo de dois minutos de destilação. Assim, são necessários mais estudos para avaliar uma possível diminuição do tempo de destilação para dois minutos. O tempo de destilação de quatro minutos atende aos critérios de exatidão para amostras semelhantes.

8. CONTRIBUIÇÃO DO ESTÁGIO À FORMAÇÃO PROFISSIONAL

A perspectiva de estagiar em um laboratório acreditado que segue a ABNT NBR ISO/IEC 17025 foi sem dúvidas de grande valia, não somente para a conclusão do curso de Química Tecnológica, mas na formação pessoal de crescimento em conhecimentos além dos obtidos na graduação. Foi possível de forma direta acompanhar a rotina de análises oficiais para posterior monitoramento de fiscalizações.

Tendo em vista a competitividade por espaço de profissionais qualificados no mercado de trabalho, é necessário adquirir experiência e conhecimento. Nesse sentido, o estágio obrigatório foi de suma importância para a formação profissional de um químico tecnológico, ainda mais porque foi realizado junto a um órgão competente e acreditado por normativas.

Ser acreditado por uma normativa como ISO 17025 garante ao seu laboratório ser requisitado em análises oficiais, por isto, ter estagiado junto a este laboratório, proporcionou-me ver o profissionalismo dos LFDAs, especificamente do SLAV-São José/SC, na garantia da geração de dados em análises laboratoriais, levando comigo que devo sempre possuir essas qualidades.

9. REFERÊNCIAS

- ¹ DOSSIÊ PROTEÍNAS: **PROTEÍNAS**. São Paulo: Fib, v. 16, n. 28, 2014. Trimestral. Disponível em: <<https://revista-fi.com.br/revista/60/#p=58>>. Acesso em: 30 mar. 2020.
- ² DAMODARAN S.; PARKIN K. L.; FENNEMA O. R. **Química de alimentos de Fennema**. 4^o edição. Porto Alegre, Armed 2010. 900p.
- ³ CECCHI, H. M; **Fundamentos teóricos e práticos em análises de alimentos**. Campinas: SP: Editora da Unicamp, 2003.p. 60-70.
- ⁴ OLEGARIO, T. G.; SANTOS, J. T.; SILVEIRA, P.; BOWLES, S.; MORAES, M. F. P. G. **Comparação do método de Kjeldahl e Formol em ricota probiótica**. VI Semana de Tecnologia em Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. ISSN: 1981-366X, v. 02, 2008.
- ⁵ FERREIRA, F.N; MONTEIRO, M. I. C; SILVA. L. I. D. **Determinação de Nitrogênio Total em amostras de Rocha Petrolífera pelo Método Kjeldahl/Indofenol**. Jornada de Iniciação Científica, CETEM/RJ. 2004.
- ⁶ PURIFICACIN S. Plaza; TADEUSZ M; MARA J. N; AGUSTN G. A.; SAWOMIR W. An Overview of the Kjeldahl Method of Nitrogen Determination. Part I. **Early History, Chemistry of the Procedure, and Titrimetric Finish, Critical Reviews in Analytical Chemistry**, 43:4, 178-223, 2013. DOI: 10.1080/10408347.2012.751786
- ⁷ BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos físico químicos para controle de produtos cárneos e seus ingredientes, sal e salmoura. **Instrução Normativa nº. 20**, de 21 de julho de 1999. Brasília: Diário Oficial da União, Seção 1, de 27 de julho de 1999.
- ⁸ BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 68** de 12 de dezembro de 2006. Métodos

analíticos físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília: Diário Oficial da União, 14/12/2006.

⁹ Meeker, E. W.; Wagner, E. C. Titration of Ammonia in Presence of Boric Acid. **Ind. Eng. Chem. Anal.** Ed. 1933, 5 (6), 396–398.

¹⁰ International Organization for Standardization. **ISO 1871(E)**: Food and feed products: General guidelines for the determination of nitrogen by the Kjeldhal method. 2 ed. Geneve, 2009.

10. ANEXOS**DECLARAÇÃO DE ESTÁGIO OBRIGATÓRIO**

O **Laboratório Federal de Defesa Agropecuária (LFDA)** inscrito no CNPJ n. 00.396.895/0045-46, localizado na Rua João Grumiché, 117, bairro Kobrasol, na cidade de São José/SC, declara que o aluno **Gregori Barp**, CPF **046.970.879-41**, número de matrícula da UFSC **19100051**, realizou estágio **OBRIGATÓRIO** referente a disciplina **Estágio Supervisionado (QMC 5515)** na **seção Laboratorial Avançada (SLAV/SC)** entre o período de 14/09/2020 a 30/12/2020, totalizando 450 horas.

A Instituição de Ensino UFSC em que o aluno estuda possui vínculo com esta **empresa ou órgão** e o aluno tem seu projeto de estágio de conclusão de curso supervisionado pelo Médico Veterinário **Heitor Daguer**, CRMV/SC **3.811**, CPF **028.181.174-48**.

Atenciosamente,



Heitor Daguer