

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**

CATARINA BELOTI DE MESQUITA

**PROTOCOLO LABORATORIAL PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE
PROTEÍNA BRUTA E FIBRAS**

ALEGRE - ES

2016

CATARINA BELOTI DE MESQUITA

**PROTOCOLO LABORATORIAL PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE
PROTEÍNA BRUTA E FIBRAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Orientador: Prof.^o DSc. José Geraldo de Vargas Junior

ALEGRE – ES

2016

CATARINA BELOTI DE MESQUITA

**PROTOCOLO LABORATORIAL PARA ANÁLISE QUANTITATIVA DE
PROTEÍNA BRUTA E FIBRAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Zootecnia.

Aprovado em _____ de _____ de 2016.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof.º DSc. José Geraldo de Vargas Junior
Universidade Federal do Espírito Santo
(Orientador)

Prof.º DSc. Walter Amaral Barboza
Universidade Federal do Espírito Santo

Zootecnista MSc. Júlio Francisco Valiati Marin

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Newton e Mônica, a minha irmã Raissa, às minhas tias Guida e Regina, e aos meus avôs Newton e Otília, pelo apoio incondicional.

À minha avó Luzia (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por se mostrar tão presente em minha vida. Aos meus pais por tornarem tudo possível, pelo apoio e amor incondicional de sempre. À minha irmã, por me incentivar e ajudar mesmo estando longe. À minha avó Otilia e ao meu avô Newton, a tia Regina e a tia Guida, que são exemplos de vida a serem seguidos, pelo amor, zelo e incentivo. Aos meus tios e tias, aos meus primos e primas pela confiança e incentivo.

Ao Milk, por ter sido meu despertador nos momentos em que mais precisei e por me lembrar que dormir é importante.

Agradeço de todo o meu coração à Cida e sua família por terem me acolhido em sua casa durante esses anos de faculdade e por terem me cuidado como parte da família. À Creuza e ao Caxias, pelo carinho e apoio.

Aos amigos, todos aqueles que a graduação me permitiu conhecer, por tornarem tantos momentos mais fáceis. Agradeço em especial à Anyara, pela paciência e ajuda no laboratório. Ao Renan, Drielly, Thamyris, Clara, Gabriel e ao Hugo, por estarem sempre por perto.

À Mari, por estar sempre disposta a me ajudar.

Ao professor Zé Geraldo por ter me orientado com tanta excelência, paciência e compreensão, por ter sido peça fundamental para a realização deste trabalho e conclusão dessa etapa em minha vida. Um verdadeiro amigo. Meus sinceros agradecimentos pela oportunidade de trabalhar com você.

Aos amigos e professores da zootecnia da UFES, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço de todo coração a todos.

“Aos outros, dou o direito de
ser como são. A mim, dou o
dever de ser cada dia melhor”

Chico Xavier

RESUMO

Objetivou-se com este estudo testar dois pesos de amostra e número de repetições para análises de proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. Foram usados milho moído, feno de Tifton 85 e farelo de soja, empregando-se pesos de 300 e 500 mg para a análise de proteína bruta, 1,5 e 3,0 g para fibra em detergente neutro e detergente ácido, com duas e quatro repetições cada peso. Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que 300 mg de amostra para análise de proteína bruta, 1,5 g para análise de fibra em detergente ácido e neutro e duas repetições, são suficientes para a determinação de proteína bruta, fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro.

Palavras-chave: método Kjeldahl, bromatologia, solução detergente

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS
LISTA DE QUADROS.....
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DAS METODOLOGIAS	10
2.1 PROTEÍNA BRUTA.....	10
2.2 FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (FDN) E ÁCIDO (FDA).....	12
3 METODOLOGIA	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
5 CONCLUSÕES	19
6 REFERÊNCIAS.....	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores encontrados de proteína bruta em função do peso da amostra e do número de repetições	16
Tabela 2 – Valores encontrados de fibra em detergente ácido em função do peso da amostra e do número de repetições	17
Tabela 3 – Valores encontrados de fibra em detergente neutro em função do peso da amostra e do número de repetições	18

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Fatores de conversão de nitrogênio total em proteína	12
Quadro 2 – Tempo médio de digestão após atingir a temperatura	15

1 INTRODUÇÃO

Antes de fornecer os alimentos aos animais, é interessante conhecer o que está sendo ofertado. A área de análise de alimentos é muito importante dentro da nutrição animal, pois abrange questões de controle de qualidade, avaliação nutricional, processamento e armazenamento de alimentos, sendo também fundamental para o entendimento dos processos fisiológicos envolvidos na obtenção de produtos finais como a carne, o ovo e o leite.

Análises típicas para determinação das características nutricionais dos alimentos incluem a avaliação de parâmetros como extrato etéreo, proteína bruta, fibra, matéria seca, entre outros, estando disponíveis na literatura diferentes metodologias e protocolos que podem ser empregados para tal função. No entanto, a escolha do método adequado é fundamental para se obter dados confiáveis e de qualidade. Portanto, para garantir que continuem fornecendo tais resultados, os métodos são frequentemente testados por meio de variações e ou mudanças em suas etapas.

O presente estudo teve por objetivo testar dois pesos de amostra e número de repetições para análises de proteína bruta, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido.

2 REVISÃO DAS METODOLOGIAS

2.1 PROTEÍNA BRUTA

Johan Kjeldahl (1849-1900) era chefe do departamento de química da Carlsberg Research Laboratory quando desenvolveu o método hoje conhecido como Método Kjeldahl para determinação de nitrogênio. Seu objetivo era estudar o teor de proteína de grãos utilizados na fabricação de cerveja por meio da quantificação de um dos principais elementos encontrados na proteína, o nitrogênio. O número de técnicas existentes na época com essa finalidade já era grande, mas não atendia as necessidades de Johan, pois eram trabalhosos e sem precisão (SÁEZ-PLAZA et al.,

2013a). Após ser apresentado à Sociedade Química Dinamarquesa em 1883, com aceitação positiva, o método foi amplamente divulgado e publicado por revistas científicas em diversos países. Em curto período de tempo sofreu modificações e foi aperfeiçoado, sendo hoje considerado o método padrão para determinação de nitrogênio usado mundialmente e aprovado por associações científicas como a AOAC International e a ISO (MOORE et al., 2010; CHEMAT; HADJ-BOUSSAAD; CHEMAT, 1998).

Apesar das mudanças na técnica do Método Kjeldahl, os princípios básicos introduzidos por seu criador permanecem os mesmos podendo ser divididos em três etapas principais (SILVA; QUEIROZ, 2002):

- Digestão: decomposição do nitrogênio utilizando solução ácida concentrada. Isso é feito mediante o aquecimento de uma amostra homogênea em ácido sulfúrico concentrado e um catalisador. O resultado final é uma solução de sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$);
- Destilação: adição de base (NaOH) em excesso à mistura da digestão ácida para converter o amônio (NH_4^+) em amônia (NH_3), seguido por aquecimento direto ou por arraste a vapor, e condensação do gás NH_3 numa solução receptora de ácido bórico mais indicador, formando o borato de amônio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$);
- Titulação: titulação do $\text{NH}_4\text{H}_2\text{BO}_3$ com uma solução-padrão de ácido clorídrico (HCl 0,1 N).

A finalidade do método é determinar o nitrogênio contido na matéria orgânica e inorgânica, no entanto, é mais indicado e utilizado em amostras de origem biológica. Nesse caso, é determinado tanto o nitrogênio proteico como o não proteico e por isso o resultado é expresso em porcentagem de proteína bruta. Para calcular o teor de proteína bruta multiplica-se a porcentagem encontrada de nitrogênio por um fator de conversão. Esse fator normalmente é adotado como sendo 6,25, pois considera-se que o teor de nitrogênio presente nas proteínas seja, em média, de 16%, desconsiderando a quantidade de nitrogênio não proteico do material que, em suma, é insignificante (LYNCH; BARBANO, 1999; SAHA et al., 2013; ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Entretanto, cada proteína apresenta uma sequência de aminoácidos e, por consequência, o teor de nitrogênio é diferente variando de 13,4% a 19,3% (SÁEZ-PLAZA et al., 2013b) podendo cada grupo de alimento ter o seu fator de conversão (Quadro 1).

Quadro 1 – Fatores de conversão de nitrogênio total em proteína

Alimento	Fator	Alimento	Fator
Farelo de centeio	5,83	Amendoim	5,46
Farelo de trigo	5,83	Castanha do Pará	5,46
Soja	6,25	Avelã	5,30
Cevada	5,83	Amêndoas	5,18
Arroz	5,95	Coco	5,30
Aveia	5,83	Leite e derivados	6,38

Fonte: Adaptado de Zenebon, Pascuet e Tiglea (2008)

Outros métodos de determinação de proteína encontram-se disponíveis no mercado como alternativa ao Método Kjeldahl, sendo eles (LOPES; SANTANA, 2005; GUIMARÃES, 2003): método de Dumas; reagente de Nessler; reação de Biureto; espectrofotometria de refletância no infravermelho proximal (NIRS); espectroscopia em ultravioleta; método de Lowry; método de Bradford; e outros.

2.2 FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO (FDN) E ÁCIDO (FDA)

A fibra bruta, como apresentado por Wilhelm Henneberg e Friedrich Stohmann no ano de 1864 pelo Sistema Weende de Análise de Alimentos, é um parâmetro analítico que separa os componentes das plantas em frações fibrosas digestíveis e menos digestíveis por meio da extração em solução ácida e básica (VAN SOEST, 1994). Os compostos menos digestíveis permanecem após as extrações que são a celulose e a lignina insolúvel em álcali. Os digestíveis, que são classificados como extratos não-nitrogenados (ENN), são os amidos, lipídios e compostos solúveis em água (SOUZA et al., 1999). Partindo da visão nutricional, essa separação é insatisfatória, pois também inclui no grupo dos ENN a hemicelulose, a lignina solúvel em álcali e a pectina que apresentam características nutricionais que comprometem a digestibilidade dos componentes que deveriam ser os mais digestíveis, resultando em valores que não correspondem ao teor verdadeiro de fibra do alimento (SILVA; QUEIROZ, 2002; CHURCH, 1993; NEUMANN, 2002; MACEDO JÚNIOR et al., 2007). Por esse motivo, profissionais da área de animais ruminantes passaram a desconsiderar a fibra bruta como um parâmetro de avaliação (LIMA, 2003).

Para contornar esse problema, Peter J. Van Soest na década de 1960 desenvolveu um sistema que possibilita a melhor separação das frações fibrosas da amostra por meio da utilização de soluções detergentes.

Van Soest (1963) propôs uma solução detergente neutra, que após ter sofrido diversas modificações e adaptações, atualmente é composta por sulfato láurico de sódio, ácido etilenodiaminotetracetato (EDTA), borato de sódio hidratado, fosfato ácido de sódio anidro e trietileno glicol. Essa solução dissolve apenas a parte solúvel da fração fibrosa que é formada por compostos nitrogenados, lipídios, amido, pectina e compostos solúveis em água, permanecendo a fração insolúvel denominada fibra em detergente neutro (FDN), que é constituída de celulose, hemicelulose, lignina e proteína insolúvel (RODRIGUES, 2010). O sulfato láurico de sódio é responsável pela solubilização das proteínas e o EDTA por quelatar o cálcio auxiliando na digestão das proteínas e pectinas. O borato de sódio hidratado e o fosfato ácido de sódio anidro mantêm o pH da solução próximo a 7,0 para que a hemicelulose e a lignina não sejam solubilizadas e o trietileno glicol ajuda na remoção de algumas substâncias não fibrosas (MERTENS, 2002).

A técnica original não era eficaz em alimentos que possuíam elevado teor de amido, resultando em valores de FDN acima do esperado. Por esse motivo, na etapa inicial da análise é adicionada alfa-amilase estável ao calor e em certos casos é adotado tratamento prévio com solução de ureia. O sulfito de sódio aparece como de uso opcional com a finalidade de reduzir a contaminação por proteínas. No entanto, sua aplicação em alimentos para ruminantes é desaconselhável, pois produz resultados inconsistentes de FDN (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991).

Na sequência de seus estudos, Van Soest (1967) apresentou a solução detergente ácida. Contendo ácido sulfúrico e brometo-cetil-trimetilamônio (CTAB), a solução permite que a porção menos solúvel da parede celular, chamada de fibra em detergente ácido (FDA), seja determinada. O ácido sulfúrico solubiliza os açúcares, amidos, hemicelulose e pectinas, enquanto o CTAB promove a remoção das proteínas, mantendo como resíduo a celulose, lignina, proteína insolúvel, cinza e sílica. Mesmo sendo metodologia empregada na avaliação de forragens, não é considerada fração válida para uso nutricional (BORTOLASSI et al., 2000). No entanto, pode ser usada como fase preparatória para a determinação da lignina, nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), cinza insolúvel em detergente ácido (CIDA), celulose e sílica (VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991). A hemicelulose

também pode ser determinada através da FDA. O seu valor é estimado pela diferença entre os valores de FDN e FDA.

3 METODOLOGIA

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bromatologia e Nutrição Animal da Universidade Federal do Espírito Santo, no campus de Alegre. Os alimentos utilizados nas análises foram milho moído, feno de Tifton 85 e farelo de soja, sendo inicialmente determinados seus valores de matéria seca (88,47%, 86,33% e 89,84%, respectivamente).

As metodologias adotadas foram adaptadas a partir das recomendações de Silva e Queiroz (2002). Para cada metodologia, foram empregados dois pesos, 2 e 4 repetições, totalizando 12 unidades experimentais por alimento.

Na determinação de nitrogênio pelo processo semimicro Kjeldahl, foram empregados dois pesos de amostra, 300 e 500 mg, pesados em balança analítica e acondicionados em tubos de ensaio próprios para o tipo de análise. Foram adicionados 2,5 g de mistura digestora composta por sulfato de potássio e sulfato de cobre pentaidratado e, em seguida, 10 ml de ácido sulfúrico concentrado. Em bloco digestor, as amostras passaram por uma digestão de aproximadamente 4 horas, com aumento gradativo da temperatura até 350°C (Quadro 2), e quando a solução atingiu a coloração verde-claro, foi mantido por mais 15 minutos. Após a solução alcançar temperatura ambiente, foi adicionado 20 ml de água destilada e, em seguida, feita a destilação por arraste a vapor com 25 ml de hidróxido de sódio a 50% em destilador de nitrogênio modelo SL-74. O produto destilado foi coletado em erlenmeyer contendo 50 ml de água destilada e 50 ml de solução de ácido bórico a 4% + indicador (solução mista de vermelho de metila e verde de bromocresol). O volume do destilado de aproximadamente 100 ml foi titulado com solução padronizada de ácido clorídrico 0,1 N. Em conjunto com as amostras, foi feito um teste em branco para eliminar a interferência e contaminação dos reagentes.

Quadro 2 – Tempo médio de digestão após atingir a temperatura

Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
100	30
150	30
200	15
250	15
300	15
350	Até atingir a coloração verde-claro

A porcentagem de nitrogênio foi calculada pela fórmula:

$$\% N = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_b) \times 0,1 \times f \times 14}{P} \times 100$$

Em que:

V_{HCl} = volume de HCl gasto na titulação;

V_b = volume de HCl gasto no teste em branco;

f = fator de correção do HCl 0,1 N;

14 = equivalente-grama do nitrogênio;

P = peso da amostra em mg.

Para calcular a porcentagem de proteína bruta, multiplicou-se o valor de nitrogênio pelo fator de conversão 6,25.

A determinação da FDN foi realizada em digestor para fibra modelo MA444/CI. Foram empregadas amostras de 1,5 e 3,0 g, pesados em balança analítica em sacos próprios para extração, sendo que cada alimento foi digerido separadamente. Foram preparados e utilizados 2 litros de solução detergente neutro para garantir que as amostras ficassem imersas durante todo o processo de digestão. Foi acrescentado 50 µl de alfa amilase estável ao calor por número de amostra, totalizando 0,6 ml. O tempo de extração (1 hora) foi contado a partir do momento em que a temperatura atingiu 98°C. Após a extração, os sacos com os resíduos foram lavados com água destilada fervente no próprio aparelho. Foram feitas duas lavagens com duração de 2 minutos cada. Terminado esse processo, as amostras foram deixadas de repouso em um béquer, por dois minutos, em 360 ml de acetona (30 ml/saco). Esse processo foi repetido duas vezes. As amostras foram acondicionadas em cadinhos e levadas a estufa a 100°C por 8 horas. Após a secagem foi realizada a queima do material em mufla a 550°C por 2 horas.

O procedimento para determinação da FDA foi o mesmo da FDN, porém a solução usada foi solução detergente ácido e não foi acrescentada alfa amilase.

A porcentagem da FDN e FDA foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ FDN ou FDA} = \frac{(R \times 100)}{P}$$

Em que:

R = resíduo da extração após estufa menos resíduo da mufla

P = peso da amostra sem o saco

Os dados foram corrigidos para a matéria seca dos alimentos e submetidos à análise estatística, utilizando-se o programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genética) da Universidade Federal de Viçosa (1997), por meio de teste F e de Student-Newman-Kells (SNK) a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar a proteína bruta dos alimentos milho, farelo de soja e feno constatou-se que o peso da amostra e número de repetições, e sua interação, não influenciaram nos resultados encontrados (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Galvani e Gaertner (2006) que ao proporem a redução da quantidade de amostra e de reagentes utilizados no método Kjeldahl concluíram que não houve diferença significativa nos valores de proteína bruta de três espécies forrageiras.

Tabela 1 – Valores encontrados de proteína bruta em função do peso da amostra e do número de repetições

Peso (mg)	Milho			Farelo de soja			Feno		
	nº de repetições			nº de repetições			nº de repetições		
	2	4	Média	2	4	Média	2	4	Média
300	10,67	11,04	10,86 ^{ns}	50,46	50,44	50,45 ^{ns}	10,90	10,92	10,91 ^{ns}
500	10,45	10,78	10,61 ^{ns}	50,81	50,47	50,64 ^{ns}	10,83	10,87	10,85 ^{ns}
Média	10,56 ^{ns}	10,91 ^{ns}		50,63 ^{ns}	50,46 ^{ns}		10,87 ^{ns}	10,89 ^{ns}	
CV (%)	3,682			1,665			1,072		

*Efeito significativo; ns – Não significativo; α =5% de probabilidade; CV – Coeficiente de variação

Em relação aos valores de FDA, não houve efeito significativo para nenhuma das variáveis testadas no feno de Tifton. Para o milho e o farelo de soja, foi observada diferença significativa para o fator peso de amostra, onde o maior peso apresentou maior %FDA (Tabela 2), o que não justifica o seu uso, pois apresentou grande desvio da média, sendo $8,44 \pm 3,34$ para milho e $31,94 \pm 8,76$ para o farelo de soja. Para o peso de 1,5g o desvio foi menor, com $4,89 \pm 0,41$ e $22,11 \pm 4,88$ para milho e farelo de soja, respectivamente, permitindo inferir que em maiores pesos de amostra é necessário rever quantidade de reagente, tempo de queima, tamanho de cadinho, etc.

Tabela 2 – Valores encontrados de fibra em detergente ácido em função do peso da amostra e do número de repetições

Peso (mg)	Milho nº de repetições			Farelo de soja nº de repetições			Feno nº de repetições		
	2	4	Média	2	4	Média	2	4	Média
1,5	4,79	5,00	4,89*	25,54	18,67	22,11*	41,68	41,18	41,43 ^{ns}
3,0	6,47	10,40	8,44*	33,88	30,00	31,94*	44,01	43,69	43,85 ^{ns}
Média	5,63 ^{ns}	7,70 ^{ns}		29,71 ^{ns}	24,33 ^{ns}		42,85 ^{ns}	42,43 ^{ns}	
CV (%)			30,2			27,718			6,897

*Efeito significativo; ns – Não significativo; $\alpha=5\%$ de probabilidade; CV – Coeficiente de variação

Farelo de soja não apresentou efeito significativo para FDN quando avaliado peso de amostra e número de repetições, enquanto que para milho e feno houve efeito significativo (Tabela 3). Observa-se ainda que, numericamente, tanto o milho quanto o farelo de soja, os valores encontrados foram superiores aos apresentados em tabelas nutricionais. Segundo Rostagno et al. (2011), milho e farelo de soja apresentam, respectivamente, 11,93% e 13,79% de FDN. Em alimentos com alta concentração de amido, há certa dificuldade da solução de FDN em promover a detergência da amostra, o que atrapalha o processo de digestão proporcionando valores de FDN acima do esperado.

Tabela 3 – Valores encontrados de fibra em detergente neutro em função do peso da amostra e do número de repetições

Peso (mg)	Milho nº de repetições			Farelo de soja nº de repetições			Feno nº de repetições		
	2	4	Média	2	4	Média	2	4	Média
1,5	45,35	44,08	44,71*	20,46	22,96	21,71 ^{ns}	78,89	78,79	78,84*
3,0	59,56	58,37	58,96*	23,23	25,44	24,34 ^{ns}	80,20	79,44	79,82*
Média	52,45 ^{ns}	51,22 ^{ns}		21,84 ^{ns}	24,20 ^{ns}		79,55 ^{ns}	79,11 ^{ns}	
CV (%)			11,18			11,371			0,606

*Efeito significativo; ns – Não significativo; $\alpha=5\%$ de probabilidade; CV – Coeficiente de variação

Na metodologia de determinação de FDN, tanto alimentos com alto e baixo teor de amido, utiliza-se a alfa amilase no processo de digestão da amostra. No entanto, para alimentos com alto amido recomenda-se que seja incluído tratamento com ureia (SILVA; QUEIROZ, 2002; VAN SOEST; ROBERTSON; LEWIS, 1991).

5 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que 300 mg de amostra para análise de proteína bruta, 1,5 g para análise de fibra em detergente ácido e neutro e duas repetições, são suficientes para a determinação de proteína bruta, fibra em detergente ácido e fibra em detergente neutro.

6 REFERÊNCIAS

BORTOLASSI, J. R. et al. Comparação dos métodos convencional e Filter Bag Technique da Ankon (FBT) para determinação de fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 3, p. 807-811, 2000.

CHEMAT, Z.; HADJ-BOUSSAAD, D. E.; CHEMAT, F. Application of atmospheric pressure microwave digestion to total Kjeldahl nitrogen determination in pharmaceutical, agricultural and food products. **Analisis**, v. 26, p. 205-209, 1998.

CHURCH, D. C. **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Editorial Acribia, S.A., 1993.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. **Embrapa Pantanal, Circular Técnica**, 63.

GUIMARÃES, P. C. **Estimativa dos teores de fenilalanina em sopas desidratadas instantâneas: importância do nitrogênio de origem não protéica**. São Paulo: USP, 2003. 91 f. Dissertação (Mestrado em Bromatologia) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

LIMA, M. L. M. **Análise comparativa da efetividade da fibra de volumosos e subprodutos**. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

LOPES, D. C.; SANTANA, M. C. A. **Determinação de proteína em alimentos para animais: métodos químicos e físicos**. Viçosa: UFV, 2005.

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, n. 6, p. 1389-1398, 1999.

MACEDO JÚNIOR, G. L. et al. Qualidade da fibra para a dieta de ruminantes. **Ciência Animal**, v. 17, n. 1, p. 7-17, 2007.

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.

MOORE, J. C. et al. Total protein methods and their potential utility to reduce the risk of food protein adulteration. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 330-357, 2010.

NEUMANN, M. **Avaliação, composição, digestibilidade e aspectos metabólicos da fibra**. Seminário. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, 2002.

RODRIGUES, R. C. Métodos de análises bromatológicas de alimentos: métodos físicos, químicos e bromatológicos. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. **Embrapa Clima Temperado, Documentos**, 306.

ROSTAGNO, H. S. et al. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2011.

SÁEZ-PLAZA, P. et al. An overview of the Kjeldahl Method of nitrogen determination. Part II. Sample preparation, working scale, instrumental finish, and quality control. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 224-272, 2013a.

SÁEZ-PLAZA, P. et al. 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**, v. 43, n. 4, p. 178-223, 2013b.

SAHA, U. et al. Common terms used in animal feeding and nutrition. **University of Georgia Cooperative Extension Bulletin 1367**, 2013.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002.

SOUZA, G. B. et al. Método alternativo para a determinação de fibra em detergente neutro e detergente ácido. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 1999. **Embrapa Pecuária Sudeste, Boletim de Pesquisa**, 4.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA – UFV. SAEG – **Sistema para análise estatística e genética**. Viçosa, MG: Fundação Arthur Bernardes, 1997.

VAN SOEST, P. J. Development of a comprehensive system of feed analyses and its application to forages. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE, 58, 1967, New Brunswick.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994.

VAN SOEST, P. J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. **Journal of the Association Official Agricultural Chemists**, v. 46, n. 5, p. 829-835, 1963.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 10, p. 3583-3597, 1991.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coords.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.