

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

SAMUEL GIOVANAZ

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DUMAS PARA A ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM
ALIMENTOS LÁCTEOS**

Porto Alegre

2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

SAMUEL GIOVANAZ

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DUMAS PARA A ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM
ALIMENTOS LÁCTEOS**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado junto à atividade de ensino
“Projeto Tecnológico” do curso de Química
Industrial, como requisito parcial para
obtenção do grau de Química Industrial.
Orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Porto Alegre
2022

G512 Giovanaz, Samuel

Validação do método de Dumas para a análise de proteínas em alimentos lácteos / Samuel Giovanaz – Porto Alegre, 2022.
48 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Eliseu Rodrigues.

1. Alimento lácteo. 2. Dumas. 3. Kjeldahl. I. Rodrigues, Eliseu. II. Título.

CDU 637.13

SAMUEL GIOVANAZ

**VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DUMAS PARA A ANÁLISE DE PROTEÍNAS EM
ALIMENTOS LÁCTEOS**

Trabalho de Conclusão de Curso

Aprovado pela banca examinadora em 04 de outubro de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Orientador

Prof.^a Dr.^a Carla Sirtori

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dr.^a Silma Alberton Corrêa

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Roberto e Maria Inês, pelo carinho e amor expressos em cada atitude, sendo responsáveis por moldar o meu caráter e educação me possibilitando chegar onde estou e ser grato por cada momento vivido. Por serem meu porto-seguro quando era necessário parar, repensar e recomeçar. As suas presenças foram primordiais para que isso fosse possível. Amo vocês.

Ao meu avô Arduíno (*in memoriam*) que, na sua simplicidade, sempre foi dos maiores exemplos de luta, perseverança e conduta que eu poderia seguir. A verdade e dedicação despejada em cada encontro, dentro dos breves anos que partilhamos, é maior do que qualquer agradecimento que possa ser feito.

Aos meus irmãos, que compartilharam comigo, mesmo que à distância, alegrias e tristezas das mais diferentes formas.

Aos amigos que a vida me trouxe e fizeram dessa caminhada mais leve e prazerosa o meu agradecimento pois sem vocês muito não seria possível.

Agradeço ao professor Eliseu, que aceitou ser meu orientador e esteve sempre disponível me dando o suporte necessário para a realização desse trabalho.

Agradeço aos meus amigos e colegas do LFDA, pela paciência, apoio e amizade durante a realização desse trabalho de conclusão de curso, mas também na nossa rotina.

RESUMO

As proteínas do leite apresentam grande relevância nutricional para a sociedade. A regulação e o controle do teor de proteínas em produtos e derivados lácteos em âmbito nacional é de responsabilidade do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A metodologia de referência para determinação do teor de proteínas nestes produtos é o método Kjeldahl, no qual o teor de proteína é quantificado a partir do teor de nitrogênio. Apesar de ser um método reconhecido internacionalmente pela sua exatidão e precisão, o tempo longo de análise e o alto volume de resíduos gerados tem impacto no âmbito laboratorial bem como ambiental. No presente trabalho foi implementado e validado o método Dumas para a quantificação de proteínas no Laboratório de Identidade e Qualidade de Alimentos do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (IQA/LFDA-RS), vinculado ao MAPA. Além de material de referência certificado (MRC) de leite em pó, também foram utilizadas amostras de leite fluido, leite em pó, doce de leite de consistência pastosa e sólida, leite condensado e caseinato. Testes iniciais definiram as melhores condições de análise para cada produto, resultando em massas de amostra não superiores a 200 mg e razão de 0,8 a 3,0 mL de oxigênio por mg de amostra para o processo de combustão. Os valores de coeficiente de variação (CV) encontrados foram da ordem de 0,355% a 2,031% enquanto que para a incerteza padrão expandida percentual os valores foram de 0,897% a 6,279%, sendo em ambos os casos para os produtos caseinato e leite fluido, respectivamente. Assim, os resultados encontrados atestam o método Dumas como uma metodologia adequada para a determinação de proteínas no IQA/LFDA-RS, permitindo ao órgão o emprego de um método com impacto em produtividade associado à redução na emissão de resíduos.

Palavras-chave: Dumas; Kjeldahl; alimentos lácteos; validação; vantagens; desvantagens; impacto ambiental; custos de análise; produtividade.

RESÚMEN

Las proteínas de la leche tienen una gran relevancia nutricional para la sociedad. La regulación y control del contenido de proteína en productos lácteos y derivados a nivel nacional es responsabilidad del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Abastecimiento (MAPA). La metodología de referencia para determinar el contenido proteico de estos productos es el método Kjeldahl, en el que el contenido proteico se cuantifica a partir del contenido de nitrógeno. A pesar de ser un método reconocido internacionalmente por su exactitud y precisión, el largo tiempo de análisis y el alto volumen de residuos generados tienen un impacto tanto en el laboratorio como en el medio ambiente. En el presente trabajo, se implementó y validó el método Dumas para la cuantificación de proteínas en el Laboratorio de Identidad y Calidad de Alimentos del Laboratorio Federal de Defensa Agropecuaria de Rio Grande do Sul (IQA/LFDA-RS), vinculado al MAPA. Además del material de referencia certificado (MRC) para leche en polvo, también se utilizaron muestras de leche fluida, leche en polvo, dulce de leche pastoso y sólido, leche condensada y caseinato. Las pruebas iniciales definieron las mejores condiciones de análisis para cada producto, resultando en masas de muestra no superiores a 200 mg y una relación de 0,8 a 3,0 mL de oxígeno por mg de muestra para el proceso de combustión. Los valores del coeficiente de variación (CV) encontrados fueron del orden de 0.355% a 2.031% mientras que para el porcentaje de incertidumbre estándar expandida los valores fueron de 0.897% a 6.279%, siendo en ambos casos para caseinato y leche fluida, respectivamente. Así, los resultados encontrados atestiguan que el método Dumas es una metodología adecuada para la determinación de proteínas en el IQA/LFDA-RS, permitiendo al organismo utilizar un método con impacto en la productividad asociado a la reducción de la emisión de residuos.

Palabras clave: Dumas; Kjeldahl; productos lácteos; validación; ventajas; desventajas; impacto ambiental; análisis costos; productividad.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação do reativo de biureto e formação do complexo na determinação de proteínas	19
Figura 2 – Reação esquemática do método de Lowry de determinação de proteínas	19
Figura 3 – Esquema geral de determinação de proteínas pelo método Dumas.....	23
Figura 4 – Esquema geral de funcionamento do Dumatherm DT Ar/He para determinação de proteínas (método Dumas)	26
Figura 5 – Sistema de destilação e titulação (A) e digestão (B e C) para determinação do teor de proteínas – equipamentos Gerhardt (método Kjeldahl)	27
Figura 6 – Curva analítica de teor de nitrogênio para determinação de proteínas pelo método Dumas	34
Figura 7 – Consumo de energia para realização de 1000 determinações de teor de proteínas em alimentos lácteos pelos métodos Kjeldahl e Dumas.....	39
Figura 8 – Tempo de análise por etapa do processo (método Kjeldahl x Dumas) para realização de 20 determinações de teor de proteínas em alimentos lácteos	40
Figura 9 – Tempo de análise por etapa do processo (método Kjeldahl x Dumas) para realização de 1000 determinações de teor de proteínas em alimentos lácteos	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais métodos para a determinação de proteínas	18
Tabela 2 – Dados de repetibilidade e reprodutibilidade apresentados na ISO 14891:2002, de acordo com o tipo de produto e teor de nitrogênio	25
Tabela 3 – Produtos utilizados na validação do método Dumas para determinação do teor de proteínas em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS	28
Tabela 4 – Materiais de referência certificados utilizados para teste de exatidão do método Dumas de determinação de proteínas em leite em pó	29
Tabela 5 – Condições de análise, por tipo de produto, definidas após testes iniciais	33
Tabela 6 – Figuras de mérito da validação do método Dumas (precisão, incerteza e exatidão) para a determinação de proteína em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS.....	34
Tabela 7 – Estimativa da incerteza de medição na determinação de proteínas em alimentos lácteos pelo método Dumas no IQA/LFDA-RS	36
Tabela 8 – Resultados de exatidão para a validação do método Dumas de determinação de proteínas em leite em pó no IQA/LFDA-RS.....	36
Tabela 9 – Estimativa de gastos com consumíveis para realização de 1000 determinações do teor de proteínas em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS pelo método Kjeldahl.....	38
Tabela 10 – Estimativa de gastos com consumíveis para realização de 1000 determinações do teor de proteínas em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS pelo método Dumas	38
Tabela 11 – Tempo empregado em cada etapa do processo analítico nos métodos Kjeldahl e Dumas de determinação de proteínas em alimentos lácteos	40
Tabela A 1 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz leite em pó no IQA/LFDA-RS.....	47
Tabela A 2 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz leite fluido no IQA/LFDA-RS.....	47

Tabela A 3 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz doce de leite pastoso no IQA/LFDA-RS.....	48
Tabela A 4 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz caseinato no IQA/LFDA-RS.....	48
Tabela A 5 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz leite condensado no IQA/LFDA-RS.....	49
Tabela A 6 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz doce de leite sólido no IQA/LFDA-RS.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CV	Coeficiente de variação
DPR	Desvio padrão relativo
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IQA	Laboratórios de Identidade e Qualidade de Alimentos
LFDA	Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária
LFDA-RS	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul
LQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MRC	Materiais de referência certificados
NNP	Nitrogênio não proteico
NT	Nitrogênio total
PACPOA	Programa de Avaliação de Conformidade de Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal
Tris	Tris-hidroximetil aminometano
UHT	<i>Ultra High Temperature</i> (Ultra Alta Temperatura)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	PROPOSTA TECNOLÓGICA	17
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	18
4.1.1	Método do biureto	18
4.1.2	Método de Lowry	19
4.1.3	Método do reagente de Bradford	20
4.1.4	Método Kjeldahl.....	20
4.1.5	Método Dumas.....	21
4.2	VALIDAÇÃO ANALÍTICA	23
4.2.1	Seletividade.....	23
4.2.2	Linearidade	24
4.2.3	Limite de detecção	24
4.2.4	Limite de quantificação (LQ)	24
4.2.5	Precisão	24
4.2.6	Exatidão	24
4.3	ISO 14891:2002 (IDF 185:2002)	25
5	METODOLOGIA	26
5.1	EQUIPAMENTOS.....	26
5.2	MATERIAIS	27
5.3	AMOSTRAS	27
5.3.1	Materiais de referência certificados.....	28
5.4	TESTES INICIAIS.....	30
5.5	LINEARIDADE.....	30
5.6	PRECISÃO/REPETIBILIDADE	31
5.7	PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	31
5.8	AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO	31
5.9	EXATIDÃO/Z-SCORE	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33

7	DUMAS VERSUS KJELDAHL	37
7.1	ESTIMATIVA DE CUSTOS	37
7.2	PRODUTIVIDADE E AUTOSSUFICIÊNCIA.....	39
7.3	GERAÇÃO DE RESÍDUOS E IMPACTO AMBIENTAL	41
8	CONCLUSÃO	43
	REFERÊNCIAS	44
	APÊNDICE A – Repetibilidade e precisão intermediária	47

1 INTRODUÇÃO

As proteínas desempenham um papel central nos sistemas biológicos, onde atuam como catalisadores biológicos (enzimas), hormônios, proteínas de transporte, estrutural e contrátil, antígenos/anticorpo, função nutricional, neurotransmissores e transportadores nas membranas.¹ Elas são formadas por 21 aminoácidos diferentes, os quais de acordo com o número e ordem formam todas as proteínas, desde aquelas presentes em microrganismos até aquelas presentes nos alimentos.

O leite, as carnes, os ovos, os cereais, as leguminosas e as oleaginosas são as principais fontes de proteínas da dieta humana.² A última pesquisa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostrou que a mistura arroz e feijão é a principal fonte de proteínas dos brasileiros. A Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil mostra que a frequência de consumo alimentar da mistura arroz e feijão supera os 60% enquanto que a de carne bovina e leite integral é de 38,2% e 6,5%, respectivamente.³

O leite ocupa destaque como fonte de proteínas para a dieta humana. A caseína é o principal componente da fração proteica do leite, perfazendo cerca de 80% do total das proteínas presentes no produto. Outros componentes proteicos encontrados no leite são as proteínas do soro lácteo que constituem cerca de 20% da fração proteica do leite e, portanto, juntamente com a caseína englobam praticamente o total das proteínas presentes no leite.⁴

As proteínas do soro de leite apresentam um dos mais altos índices de valor biológico. As proteínas do soro contêm níveis elevados dos aminoácidos essenciais leucina e lisina em comparação ao isolado proteico de soja ou clara de ovo desidratada. Além disso, as proteínas do soro são uma boa fonte de aminoácidos contendo enxofre, tais como a cisteína e metionina.⁵

O monitoramento do teor de proteínas no leite é uma análise de rotina em diferentes laboratórios públicos e privados. Essa análise é conduzida para avaliar a qualidade do leite bem como de possíveis fraudes ou adulterações. Adulterações em leites geralmente estão relacionadas a más condições de higiene, de processamento, armazenamento, transporte e comercialização enquanto que produtos fraudados caracterizam-se por práticas vedadas visando ganho financeiro.

Há na literatura vários métodos para a determinação de proteínas em alimentos, nomeadamente: método do biureto, de Lowry e do reagente de Bradford,

baseados na determinação espectrofotométrica; método Kjeldahl e método Dumas, os quais estimam o teor de proteínas com base no teor de nitrogênio presente na amostra.

A fração nitrogenada do leite apresenta duas principais fontes: a proteica, oriunda da caseína e das proteínas do soro e, o nitrogênio não proteico (NNP). Os compostos nitrogenados presentes na fração de NNP são basicamente produtos finais do metabolismo do nitrogênio e representam de 5 a 6% do nitrogênio total (NT). Entre estes compostos estão ureia, peptídeos, aminoácidos, ácido úrico, creatina e creatinina.

No método Kjeldahl ocorre a transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é “fixada” em solução ácida e titulada. Os resultados podem ser expressos como proteína através da multiplicação da porcentagem do NT por fatores específicos, de acordo com o produto analisado. Internacionalmente referenciado como metodologia de referência para determinação de NT (proteína bruta) é suscetível a erros, pois divide-se em várias etapas, é demorado e gera alto volume de resíduos.⁶

A proteína do leite e seus derivados é comumente expressa como proteína total ou proteína bruta e sob o ponto de vista analítico, corresponde ao teor percentual de NT multiplicado pelo fator de conversão 6,38, o qual é estimado com base no teor médio de nitrogênio nas proteínas do leite (15,67%).

No método Dumas a amostra passa por combustão sob fluxo de oxigênio controlado seguindo para um processo de redução, onde o óxido nítrico produzido pela combustão é reduzido a nitrogênio molecular. A detecção do teor de nitrogênio é realizada com um detector de condutividade térmica que mede o NT restante em uma corrente de gás de arraste. O método Dumas é rápido, evita o uso de produtos químicos corrosivos e tem baixo volume de resíduos gerados, contudo não só quantifica proteína, mas também considera nitrogênio inorgânico, incluindo nitrato, nitrito e alguns outros orgânicos, como ácidos nucleicos podendo levar a superestimação do conteúdo proteico.⁶ Além disso é uma metodologia de alto custo.

No âmbito nacional o organismo responsável pelo controle da qualidade de alimentos é a Rede de Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDA) vinculada ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). A Rede LFDA é a responsável por fornecer dados técnicos e resultados de análises

laboratoriais que compõe a tomada de decisão no âmbito da defesa agropecuária.⁷ As unidades que realizam o monitoramento de produtos lácteos nos LFDAs são os Laboratórios de Identidade e Qualidade de Alimentos (IQA), também incumbidas da identificação de fraudes, estudo e desenvolvimento de pesquisas de aprimoramento e implementação de metodologias analíticas.

O manual de Métodos Oficiais para Análise de Produtos de Origem Animal⁸ do MAPA padroniza como métodos oficiais de determinação de proteínas em alimentos os referenciados na ISO 14891:2002 (IDF 185:2002),⁹ relativa ao método Dumas, e ISO 8968-1:2014 (IDF 20-1:2014),¹⁰ relativa ao método Kjeldahl. Os métodos espectrofotométricos não são apresentados como métodos oficiais no manual do MAPA dada a necessidade de tratamento prévio da amostra e impacto dos interferentes no processo de leitura, além de não estarem publicadas normas de referência internacional que indiquem a ampliação destes métodos para determinação de proteínas em produtos lácteos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Validar o método Dumas para a determinação de proteína em matrizes lácteas no IQA do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária do Rio Grande do Sul (LFDA-RS), seguindo a ISO 14891:2002 (IDF 185:2002) e o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Área de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para cumprir o propósito maior, foram realizados os seguintes objetivos específicos:

- a) determinar as condições ideais de velocidade de queima, aporte e fluxo de oxigênio, massas de amostra e adsorvente;
- b) avaliar o desempenho do método através de estudo de parâmetros de mérito;
- c) comparar o método de Dumas validado e o método Kjeldahl (método de referência) considerando custos envolvidos, produtividade e geração de resíduos.

3 PROPOSTA TECNOLÓGICA

O presente trabalho traz como proposta tecnológica a implementação do método de Dumas no IQA/LFDA-RS como uma metodologia alternativa ao método de referência na determinação de proteína, diminuição do volume de resíduos gerados, redução do tempo de análise e consequente ganho de produtividade.

A implementação da metodologia Dumas na unidade é vista num contexto de alinhamento à missão e objetivos estratégicos institucionais de promover o desenvolvimento sustentável da agropecuária e a segurança e competitividade de seus produtos, além de apresentar excelência na prestação de serviços laboratoriais para a Defesa Agropecuária.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

Há na literatura dezenas de métodos para determinar o teor de proteínas nos alimentos, os quais diferenciam-se em relação ao princípio envolvido, equipamentos utilizados, tempo de análise e custo. Na Tabela 1, estão apresentados os principais métodos utilizados para a determinação de proteínas:

Tabela 1 – Principais métodos para a determinação de proteínas

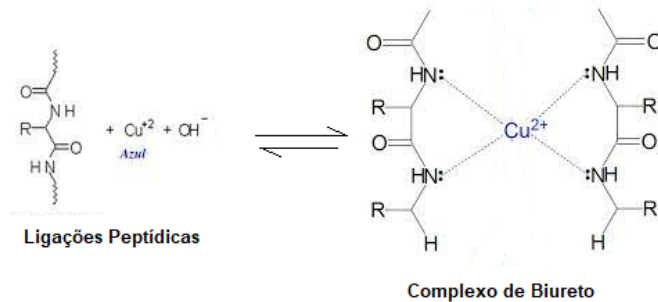
Método	Princípio de determinação	Normas de Referência para análise de produtos lácteos
Biureto	Espectrofotométrico	Não existe
Lowry	Espectrofotométrico	Não existe
(Reagente de) Bradford	Espectrofotométrico	Não existe
Kjeldahl	Análise elementar – quantificação de nitrogênio	ISO 8968-1:2014 (IDF 20-1:2014) ¹⁰
Dumas	Análise elementar – quantificação de nitrogênio	ISO 14891:2002 (IDF 185:2002) ⁹

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.1 Método do biureto

O método se baseia na reação do reativo do biureto, o qual é composto de uma mistura de cobre e hidróxido de sódio. O cobre, em meio alcalino, reage com a ligação peptídica das proteínas formando um complexo quadrado planar, Figura 1. Esse complexo apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm.¹¹

Figura 1 – Reação do reativo de biureto e formação do complexo na determinação de proteínas



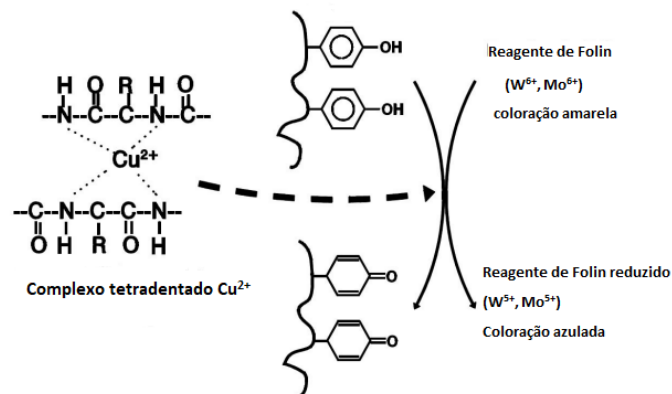
Fonte: Adaptado de Gornall, Bardawill e David, 1949.¹²

Apesar da rapidez e da utilização de reagentes de baixo custo é um método que vem sendo gradativamente substituído. Enquanto o método do biureto tem limite de detecção de $1,0 \times 10^{-3} \mu\text{g.mL}^{-1}$, os métodos espectrofotométricos considerados mais sensíveis são Lowry e Bradford apresentando limites de detecção de $1,0 \times 10^{-5}$ e $2,0 \times 10^{-5} \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.¹³

4.1.2 Método de Lowry

É uma metodologia baseada na reação de uma mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin Ciocalteu) que, ao reagir com proteínas, sofre uma redução, em presença do catalisador cobre (II), produzindo um composto com absorção máxima em 750 nm, Figura 2.

Figura 2 – Reação esquemática do método de Lowry de determinação de proteínas



Fonte: Adaptado de Azevedo, 2017.¹⁴

O método de Lowry é altamente sensível, apresenta uma melhor exatidão em relação a outros métodos, consome uma menor quantidade de amostras e está menos

suscetível a interferentes. Apesar dessas vantagens, o método apresenta longo tempo de análise, possui absorvidade específica altamente variável para diferentes proteínas e segue a lei de Lambert-Beer apenas numa pequena faixa de concentração de proteínas.¹

4.1.3 Método do reagente de Bradford

Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. Em pH ácido, a interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.¹⁵

Embora mais rápido e sensível que o método de Lowry, destacam-se entre as desvantagens o fato de apresentar variação da absorvidade específica para diferentes proteínas e resultados nem sempre reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250.

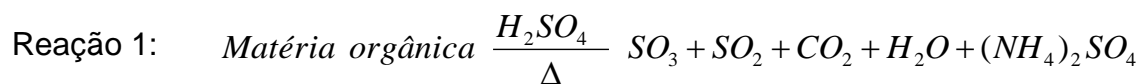
4.1.4 Método Kjeldahl

A determinação do NT proposta por Johan Kjeldahl em 1883, ainda é muito usada por ser uma técnica confiável, com rotinas bem estabelecidas e ao longo do tempo permaneceu praticamente a mesma com poucas modificações. Esta técnica possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras biológicas, assim como o nitrogênio em plantas para a avaliação do estado nutricional.¹⁶

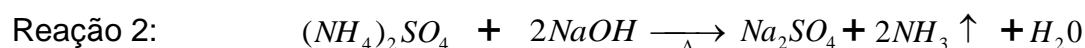
O método de Kjeldahl baseia-se na transformação do nitrogênio da amostra em sulfato de amônio através da digestão com ácido sulfúrico e posterior destilação com liberação da amônia, que é fixada em solução ácida e titulada.

Este método é dividido em três etapas principais: digestão, destilação e titulação.

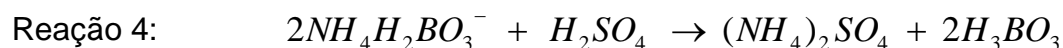
a) **Digestão:** ocorre o aquecimento da amostra com ácido sulfúrico concentrado até que o carbono e hidrogênio sejam oxidados. Com a finalidade de aumentar a velocidade de oxidação da matéria orgânica é adicionada à reação uma mistura catalítica de sulfato de cobre e sulfato de potássio. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônio, Reação 1.



b) **Destilação:** com adição de NaOH 32% e aquecimento, ocorre a liberação da amônia que é separada da mistura por destilação, Reação 2. O gás então reage com uma solução de ácido bórico, formando borato de amônio, Reação 3.



c) **Titulação:** a etapa final consiste na titulação do borato de amônio com uma solução de ácido sulfúrico padronizada, Reação 4.



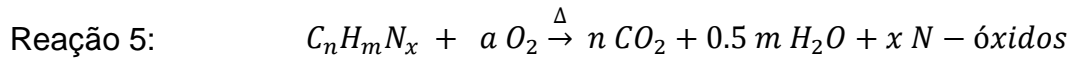
Quanto maior o volume de ácido sulfúrico gasto na titulação, maior a quantidade de nitrogênio presente na amostra.

As principais limitações dessa técnica de determinação do teor de NT são a demora na digestão das amostras que necessitam de aquecimento em bloco digestor tipo macrotubo; uso de reagentes corrosivos em concentrações elevadas; geração de grandes volumes de resíduos que necessitam de neutralização antes do descarte; possibilidade de vazamentos no sistema de destilação, que resulta em subestimação dos teores de nitrogênio.¹⁷

4.1.5 Método Dumas

O método de Dumas foi desenvolvido em 1831 pelo químico francês Jean Baptiste Dumas e foi o primeiro método descrito para análise de nitrogênio e proteína.⁶ Baseia-se na combustão de amostras orgânicas em um sistema hermeticamente fechado, gerando água e óxidos de carbono e de nitrogênio, Reação 5. Os gases

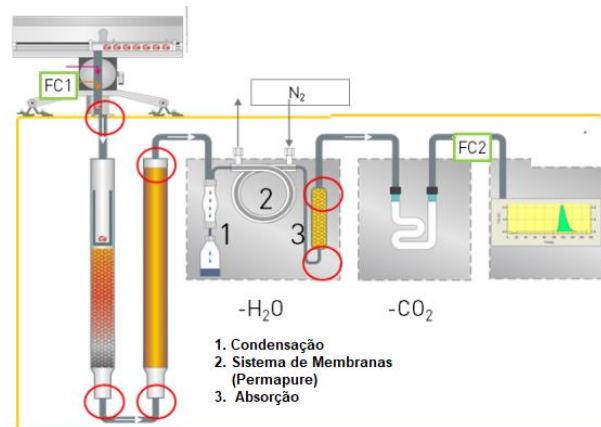
produzidos passam por uma etapa subsequente de redução, transformando os óxidos de nitrogênio em nitrogênio molecular, que é quantificado, Reação 6.



É importante destacar que, ao comparar as técnicas de determinação de nitrogênio de Dumas e de Kjeldahl, os valores obtidos na técnica de Dumas tendem a ser levemente superiores. Isso ocorre porque o nitrogênio oriundo de fonte inorgânica também passa pelo processo de redução na técnica de Dumas, sendo detectado no final do processo juntamente com o nitrogênio oriundo de fonte orgânica. Tal fenômeno não ocorre na técnica de Kjeldahl.

A amostra é submetida a um processo de combustão em condições padronizadas. Os produtos voláteis da combustão (N_2 , NO_x , CO_2 , H_2O) são transportados por um gás de arraste para uma coluna, usualmente preenchida com cobre metálico, onde os óxidos de nitrogênio são reduzidos a nitrogênio molecular. Água é removida através de um agente secante como, por exemplo, perclorato de magnésio. A menos que CO_2 seja utilizado como gás de arraste, ele é removido passando por um absorvente adequado, como hidróxido de sódio ou outro material. Interferentes (halogênios voláteis e compostos de enxofre) são removidos por absorventes ou materiais de contato (por exemplo, algodão seco, hidróxido de sódio ou outro material) ou pelo uso de material proposto pelo fabricante do equipamento. O nitrogênio na mistura residual de gás, que consiste em nitrogênio e gás de arraste, passa então por um detector de condutividade térmica. Após a amplificação e conversão do sinal do detector, os dados obtidos são processados e transferidos para o computador, conforme esquema apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Esquema geral de determinação de proteínas pelo método Dumas



Fonte: Gerhardt Analytical Systems, 2018.¹⁸

4.2 VALIDAÇÃO ANALÍTICA

A validação de método é o processo de avaliação do desempenho de um método de teste a fim de determinar se ele é capaz de produzir resultados de teste adequados para uma finalidade específica.¹⁹ Trata-se de uma confirmação através de exame e fornecimento de evidências objetivas em que as exigências particulares são atingidas para um dado uso específico.²⁰

Uma avaliação de quais parâmetros de desempenho serão utilizados para o estudo de validação e, por consequência, os seus respectivos critérios de aceitação são a base do processo como um todo.

A definição dos parâmetros de validação a serem utilizados e a abordagem utilizada podem ser baseados apenas por um guia de validação, tal como o da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ou baseado por mais de um guia ou referência quando um dos objetivos do trabalho envolve um estudo acadêmico, por exemplo. Os parâmetros de validação (ou figuras de mérito) devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir, quando aplicável: seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão/recuperação.²¹

4.2.1 Seletividade

É a propriedade de um sistema de medição, utilizado com um procedimento de medição especificado, segundo a qual o sistema fornece valores medidos para um ou

vários mensurados, tais que os valores de cada mensurando sejam independentes uns dos outros ou de outras grandezas associadas ao fenômeno, corpo ou substância em estudo.²²

4.2.2 Linearidade

É a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração, e a faixa de trabalho compreende as concentrações em que a linearidade for atingida, definindo-se, assim, a curva de calibração correspondente.²³

4.2.3 Limite de detecção

É a menor quantidade de um analito que pode ser detectado em uma amostra, mas não necessariamente quantificado como um valor exato.²¹

4.2.4 Limite de quantificação (LQ)

É a menor quantidade de um analito que pode ser quantitativamente determinada em uma amostra com adequada precisão e exatidão. Na prática, corresponde, normalmente, ao padrão de calibração de menor concentração.²¹

4.2.5 Precisão

É o grau de concordância entre indicações ou valores medidos, obtidos por medições repetidas, no mesmo objeto ou em objetos similares, sob condições especificadas.²²

4.2.6 Exatidão

É o grau de concordância entre um valor medido e um valor verdadeiro de um mensurando.²²

4.3 ISO 14891:2002 (IDF 185:2002)

A Norma Internacional ISO 14891⁹ apresenta parâmetros do método Dumas para a determinação do teor total de nitrogênio de produtos lácteos. Considerando que existem vários instrumentos Dumas, a Norma recomenda que os parâmetros para as etapas de configuração, ajustes, calibração e operação sejam seguidas conforme indicado por cada fabricante.

No que se refere a calibração do equipamento, a ISO 14891 indica o uso de compostos de nitrogênio puro padrão com um teor de nitrogênio constante e conhecido, de modo que a faixa de massa de nitrogênio distribua-se num mínimo de 10 a 20 (ou mais) pontos para amostras de até 200 mg de nitrogênio. Para mais de 200 mg de nitrogênio, espera-se que a curva de calibração seja não linear.⁹

Valores apresentados para limite de repetibilidade e limite de reprodutibilidade foram derivados de resultados de testes interlaboratoriais. Determinou-se assim que a diferença absoluta entre dois resultados de testes individuais independentes, obtidos usando o mesmo método em material de teste no mesmo laboratório pelo mesmo operador usando o mesmo equipamento dentro de um curto intervalo de tempo (repetibilidade) ou em diferentes laboratórios com diferentes operadores usando equipamentos diferentes (reprodutibilidade), será, em não mais de 5% dos casos, superior a frações de massa conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Dados de repetibilidade e reprodutibilidade apresentados na ISO 14891:2002, de acordo com o tipo de produto e teor de nitrogênio

Produto	Repetibilidade (diferença absoluta em % nitrogênio)	Reprodutibilidade (diferença absoluta em % nitrogênio)
Leite UHT* com 3,5% de gordura e 0,565% de nitrogênio	0,041%	0,041%
Leite em pó desnatado com 5,767% de nitrogênio	0,050%	0,140%
Leite condensado com 1,113% de nitrogênio	0,311%	0,311%
Caseinato de sódio com 13,684%	0,217%	0,217%

Fonte: Adaptado de ISO 14891:2002.⁹

* *Ultra High Temperature*

5 METODOLOGIA

5.1 EQUIPAMENTOS

No presente trabalho os seguintes equipamentos foram utilizados:

- a) analisador de proteína com sistema automatizado, marca Gerhardt, modelo Dumatherm DT Ar/He (FIGURA 4);

Figura 4 – Esquema geral de funcionamento do Dumatherm DT Ar/He para determinação de proteínas (método Dumas)



Fonte: Gerhardt Analytical Systems, 2018.¹⁸

- b) balança analítica com resolução de 0,1 mg – marca Metler Toledo, modelo ML104T/31;
- c) sistema automático de destilação, Marca Gerhardt, modelo Vapodest 50 s, Figura 5-A;
- d) bloco digestor, Marca Gerhardt, modelo KB/KBL, Figura 5-B;

e) sistema de sucção para neutralização de vapores resultantes de digestão ácida – Scrubber-Turbosog, marca Gerhardt, modelo TUR/TVK, Figura 5-C.

Figura 5 – Sistema de destilação e titulação (A) e digestão (B e C) para determinação do teor de proteínas – equipamentos Gerhardt (método Kjeldahl)



Fonte: Adaptado de Gerhardt Analytical Systems, 2019.²⁴

5.2 MATERIAIS

Os seguintes reagentes foram utilizados para o desenvolvimento do trabalho:

- ácido etilenodiaminotetracético anidro (EDTA), Sigma Aldrich, pureza $\geq 99\%$;
- tris-hidroximetil aminometano (Tris), Merck, pureza $\geq 99,89\%$;
- cápsulas de estanho, DumaFoil – Gerhardt;
- adsorvente para amostras líquidas e pastosas, DumaSorb – Gerhardt;
- hélio grau 6.0 – Air Liquide;
- oxigênio grau 6.0 – Air Liquide;
- ar comprimido, isento de óleo e gás (grau 2.6).

5.3 AMOSTRAS

Para verificação de desempenho foram utilizadas amostras de produtos lácteos comerciais coletados no Programa de Avaliação de Conformidade de Parâmetros Físico-Químicos e Microbiológicos de Produtos de Origem Animal (PACPOA) do MAPA. Foram selecionados arbitrariamente uma amostra de cada matriz

representativa de derivados lácteos para avaliação dos parâmetros de mérito do método Dumas, Tabela 3. Dessa forma conduziram-se os testes em 01 amostra de leite UHT integral, 01 amostra de doce de leite de consistência pastosa, 01 amostra de doce de leite de consistência sólida (formato de cubos), 01 amostra de leite condensado integral e 01 amostra de caseinato em pó.

Tabela 3 – Produtos utilizados na validação do método Dumas para determinação do teor de proteínas em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS

Amostra	Marca	Data de Fabricação	Data de Validade
Caseinato de cálcio	Alibra CA90	09/12/2020	09/12/2021
Doce de leite integral (pastoso)	Bom Princípio	03/11/2020	03/11/2021
Doce de Leite integral (sólido)	Borrazópolis	06/06/2021	06/09/2021
Leite condensado integral	Áurea	15/03/2021	15/09/2021
Leite UHT integral	Megamilk	09/07/2021	06/11/2021

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.1 Materiais de referência certificados

Para avaliar a exatidão do método foram utilizados materiais de referência certificados (MRC) de leite em pó. Os MRCs analisados foram muva-MP-0212 e muva-MP-0218, comercializados por MUVA KEMPTEN GMBH e as respectivas informações são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Materiais de referência certificados utilizados para teste de exatidão do método Dumas de determinação de proteínas em leite em pó

Identificação	Data de produção	Prazo de validade	Parâmetro	Unidade de Medida	Valor de Referência	Incerteza Expandida	Desvio Padrão
muva-MP-0212	Outubro 2015	Outubro 2022	Gordura	g/100 g	0,83	± 0,13	± 0,16
			Extrato Seco	g/100 g	96,79	± 0,14	± 0,21
			Proteína	g/100 g	38,37	± 0,11	± 0,30
			Teor de Cinzas	g/100 g	7,88	± 0,03	± 0,07
muva-MP-0218	Maio 2018	Maio 2025	Gordura	g/100 g	26,85	± 0,22	± 0,21
			Extrato Seco	g/100 g	96,59	± 0,09	± 0,15
			Proteína	g/100 g	26,75	± 0,06	± 0,21
			Teor de Cinzas	g/100 g	5,62	± 0,04	± 0,06

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4 TESTES INICIAIS

Na primeira etapa do trabalho foram avaliados alguns parâmetros do método de Dumas, nomeadamente: (1) velocidade de queima da amostra; (2) massa de amostra, e (3) necessidade de uso de material adsorvente. Para cada amostra analisada verificaram-se todos os parâmetros a fim de atingir a melhor condição para a referida matriz.

Os métodos otimizados seguiram um padrão de identificação composto por caracteres alfanuméricos. Padronizou-se para nomenclatura de métodos que o primeiro carácter refere-se ao fluxo de oxigênio em mL/min (A, B ou C), enquanto que a relação de mL de oxigênio por mg de amostra é definida pelos caracteres numéricos (podendo variar de 0,1 a 3,0). Para métodos iniciados pela letra A realiza-se a análise com 400 mL de oxigênio min^{-1} , para métodos B esse valor é de 300 mL min^{-1} e, de 200 mL min^{-1} para os métodos C.

As temperaturas dos fornos de combustão, redução e desgaseificação não foram alteradas, permanecendo em 980°C, 750°C e 300°C, respectivamente.

Para cada matriz avaliou-se a melhor relação massa de amostra x quantidade de oxigênio despendido no processo de combustão x intensidade de sinal e reprodutividade de resultados para definição do método.

O tempo de análise, desconsiderada a pesagem e encapsulamento, não apresentou alterações significativas, variando na faixa de 3 a 5 minutos.

5.5 LINEARIDADE

A linearidade foi avaliada considerando os derivados lácteos com menor e maior teor de proteína dentre os produtos recebidas pelo IQA/LFDA-RS, compreendendo assim valores de aproximadamente 1 g 100 g^{-1} até próximo a 90 g 100 g^{-1} de proteína. Utilizou-se para calibração EDTA da marca Sigma Aldrich, pureza $\geq 99\%$ e 9,58% de nitrogênio, e Tris da marca Merck, pureza $\geq 99,89\%$ seguindo o método A1,0 (fluxo de 400 mL de oxigênio por minuto e 1,0 mL de oxigênio por mg de amostra).

5.6 PRECISÃO/REPETIBILIDADE

A repetibilidade foi avaliada com sete medições independentes (sem variáveis de medição) realizadas por dois analistas diferentes (analistas A e B). Os coeficientes de variação de cada um dos analistas foram testados pela equação de Horwitz (EQUAÇÃO 1).

Equação 1:
$$\text{Equação de Horwitz} = CV < 2 (1-0,5 \log C)$$

Onde:

C = fração de massa expressa exponencial de 10 (por exemplo, $1 \text{ mg.g}^{-1} = 10^{-3}$);

CV = corresponde ao coeficiente de variação.

5.7 PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

A precisão intermediária (S_i) foi avaliada pela variabilidade dos resultados obtidos no laboratório, considerando diferentes analistas. Foi calculado o desvio padrão da precisão intermediária ($S_{i(j,k)}$) conforme preconizado no DOQ-CGCRE-008,²³ através da Equação 2:

Equação 2:
$$S_{i(j,k)} = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{k=1}^n (y_k - \bar{y})^2}$$

Onde:

n = nº ensaios efetuados por amostra;

y_k = cada resultado obtido;

\bar{y} = média aritmética dos resultados.

5.8 AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DE MEDIÇÃO

A incerteza padrão combinada foi determinada por meio da Equação 3, com a propagação das incertezas padrão de entrada experimentais (repetitividade e reprodutibilidade) e herdadas do teste realizado.

Equação 3:
$$u_c^2 = u_{repe}^2 + u_{repro}^2$$

Onde:

u_{repe} = incerteza padrão repetitividade,

u_{repro} = incerteza padrão precisão intermediária.

Por fim, a incerteza padrão expandida (U_y) foi calculada multiplicando-se o valor de u_c obtido na Equação 3 pelo coeficiente de abrangência $k=2,00$, com probabilidade de acerto de 95%.

5.9 EXATIDÃO/Z-SCORE

Os z-scores foram calculados para avaliar a exatidão por meio da Equação 4:

Equação 4:
$$z = \frac{(X_{lab} - X_v)}{s_v}$$

Onde:

X_{lab} = valor obtido pelo laboratório;

X_v = valor admitido como verdadeiro;

s_v = incerteza padrão do material de referência.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos testes iniciais estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Condições de análise, por tipo de produto, definidas após testes iniciais

Produto	Método	Massa (mg)	Adsorvente (mg)
EDTA*	A1,0	100	-
Leite em pó	B1,6	150-200	-
Doce de leite pastoso	B2,0	150	70-90
Doce de leite sólido	B2,0	150	-
Caseína e caseinato	B3,0	100	-
Leite fluido	C0,8	150	70-90
Bebida láctea	C0,8	250	100-120
Leite condensado	C1,2	150-180	70-90

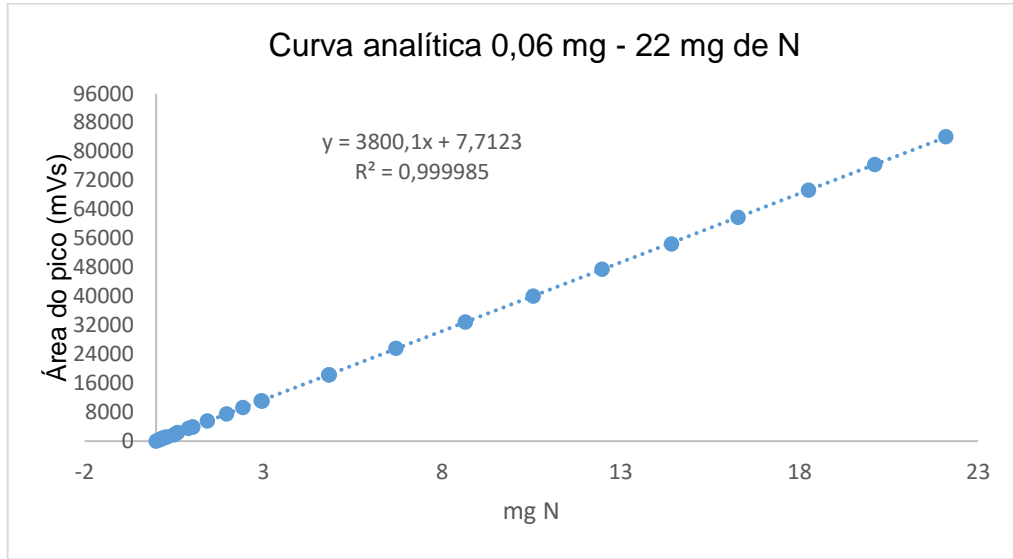
Fonte: Elaborado pelo autor.

*EDTA para verificação diária do equipamento

Verificou-se que amostras líquidas e/ou com baixo teor de proteína não demandam grande aporte de oxigênio no processo de combustão (fluxo de 200 mL/min) e tão pouco uma razão alta de mg de oxigênio por mg de amostra. Em contraponto amostras sólidas ou pastosas requerem fluxo e razão em níveis intermediários a elevados. Essa diferença era esperada considerando que as amostras líquidas utilizadas apresentam baixo teor de proteínas, na faixa de 3,5 g 100 g⁻¹ para leite fluido, enquanto que as amostras sólidas têm teores de proteínas elevado, como o leite em pó e o caseinato, de 26 a 39 g 100 g⁻¹ e acima de 80 g 100 g⁻¹, respectivamente.

A regressão linear de uma curva analítica mista de 7 pontos de solução de Tris e 21 pontos de EDTA sólido compreendendo a faixa de 0,06 a 22 mg de nitrogênio atestou a linearidade ($R^2 > 0,99$) da metodologia para a faixa em estudo, conforme pode ser verificado na Figura 6. Estendeu-se a faixa de calibração para além dos teores encontrados nas amostras avaliadas de modo a incluir os demais produtos recebidos do PACPOA pelo IQA/LFDA-RS. O LQ ficou definido como 0,06 mg de nitrogênio, correspondente ao padrão de menor concentração utilizado na curva analítica, conforme Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos.²⁵

Figura 6 – Curva analítica de teor de nitrogênio para determinação de proteínas pelo método Dumas



Fonte: Elaborado pelo autor.

O método teve seu desempenho verificado pelo estudo de precisão e exatidão, utilizando-se como referências o Manual de Garantia da Qualidade Analítica para Áreas de Identidade e Qualidade de Alimentos e de Insumos²⁵ e apresentou valores satisfatórios, conforme Tabela 6.

Tabela 6 – Figuras de mérito da validação do método Dumas (precisão, incerteza e exatidão) para a determinação de proteína em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS

Produto	Precisão / repetibilidade (DPR)	Precisão Intermediária (Si) - %	Incerteza Padrão expandida (g/100g)	Exatidão (z-score)*
Leite em pó integral	0,2079 a 0,5292%	0,5029	0,3894	0,50 ; -1,35
Leite UHT integral	1,7907 a 2,3941%	2,0313	0,2292	-
Doce de Leite pastoso	0,6697 a 1,4598%	1,2578	0,2123	-
Caseinato	0,2009 a 0,2741%	0,3548	0,7824	-
Leite condensado	0,2650 a 0,5356%	1,6637	0,2755	-
Doce de Leite sólido	0,2039 a 0,8597%	0,7155	0,1846	-

Fonte: Elaborado pelo autor.

*Para estudo de exatidão são apresentados valores para os dois MRCs utilizados.

Os valores de desvio padrão relativo (DPR) foram inversamente correlacionados com o teor de nitrogênio da amostra. Por exemplo, os maiores valores de DPR foram encontrados no leite UHT integral (teor de proteína de 3 a 4 g 100 g⁻¹), e o menor valor foi encontrado no caseinato (teor de proteína superior a 80 g 100 g⁻¹).

Os valores de incerteza padrão expandida ficaram abaixo de 4% do valor medido para todas as matrizes, com exceção do leite UHT integral que ficou ligeiramente superior a 6%, Tabela 7. Esses valores podem ser considerados satisfatórios, uma vez que as massas de amostra analisadas são da ordem de miligramas.

A exatidão do método foi atestada pelo uso de MRCs de leite em pó porque essa matriz é homogênea e possui boa estabilidade. Os valores obtidos de z-score (TABELA 8) indicam que o método é exato.

Resultados individuais e comparativos entre analistas (dados de repetibilidade e precisão intermediária) são apresentados agrupados por matriz no Apêndice A.

Tabela 7 – Estimativa da incerteza de medição na determinação de proteínas em alimentos lácteos pelo método Dumas no IQA/LFDA-RS

Produto	CV de repetitividade (%)	CV de reprodutibilidade (%)	Resultado de Medição (g 100 g⁻¹)	Incerteza Padrão Combinada (g 100 g⁻¹)	Incerteza Padrão Expandida (g 100 g⁻¹)
Leite em pó	0,0053	0,005	26,67	0,1947	0,3894
Leite fluido	0,0239	0,0203	3,65	0,1146	0,2292
Doce de leite pastoso	0,0146	0,0126	5,51	0,1062	0,2123
Caseinato	0,0027	0,0035	87,25	0,3912	0,7824
Leite condensado	0,0054	0,0166	7,88	0,1377	0,2755
Doce de leite sólido	0,0086	0,0072	8,25	0,0923	0,1846

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8 – Resultados de exatidão para a validação do método Dumas de determinação de proteínas em leite em pó no IQA/LFDA-RS

Amostra	Código	X_{lab} (g 100 g⁻¹)	X_v (g 100 g⁻¹)	S_v	z-score
Leite em pó integral	muva-MP-0212	38,42	38,37	0,11	0,5
Leite em pó integral	muva-MP-0218	26,67	26,75	0,06	-1,35

Fonte: Elaborado pelo autor.

7 DUMAS VERSUS KJELDAHL

A comparação das metodologias Dumas e Kjeldahl considerou as seguintes características: (1) custos de análise; (2) geração de resíduos; (3) tempo de análise versus demanda efetiva de pessoal, considerando ambos os equipamentos instalados IQA/LFDA-RS. Assim, não foram considerados no levantamento de custos a aquisição de equipamentos, restringindo-se o cálculo aos consumíveis empregados. Para critério de avaliação estipulou-se o número de 1000 medições/leituras.

7.1 ESTIMATIVA DE CUSTOS

O método Kjeldahl aplicado conforme a Norma ISO 8968-1:2014¹⁰ no IQA/LFDA-RS submete a amostra a digestão em sistema digestor macrotubo sendo que o preparo da amostra a ser digerida compreende as seguintes etapas: pesagem da amostra, adição do catalisador (12 g de sulfato de potássio p.a., 1 mL de solução de sulfato de cobre 5% e 20 mL de ácido sulfúrico concentrado). Paralelamente às amostras são digeridos os materiais utilizados como controle da digestão, sendo um tubo para sacarose (~0,85 g) utilizada como branco no cálculo do teor de proteína e, em outro 0,25 g do leite em pó certificado (a ISO 8968-1:2014¹⁰ recomenda o uso de triptofano alternativamente). Para os controles procede-se o preparo para digestão conforme mencionado para as amostras.

Após a digestão as amostras e controles são destilados em sistema automatizado com adição de água ultra pura e 80 mL de solução 32% de NaOH, enquanto o volume destilado é recolhido em 80 mL de solução 2% de ácido bórico. Titula-se com ácido sulfúrico 0,1 N. Para controle da destilação utiliza-se 5 mL de solução de sulfato de amônio 2%, adicionado a um tubo vazio diretamente no momento da destilação, sem necessidade de realizar digestão. Em outro tubo substitui-se o sulfato de amônio por 5 mL de água ultra pura para controle de valor de branco da análise e ambos controles são destilados e titulados conforme descrito anteriormente.

A Tabela 9 apresenta projeção de custos para os consumíveis utilizados, considerando o valor de compra da sua forma comercializada e gasto proporcional para 1000 análises.

Tabela 9 – Estimativa de gastos com consumíveis para realização de 1000 determinações do teor de proteínas em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS pelo método Kjeldahl

Item	Valor unitário	Valor /1000 análises
Leite em pó certificado – <i>European Comission</i> (50g)	R\$ 827,20	R\$ 206,80
Sulfato de cobre p.a. (500g)	R\$ 66,66	R\$ 0,67
Ácido Sulfúrico p.a. (L)	R\$ 249,99	R\$ 4.999,80
NaOH p.a. (Kg)	R\$ 50,00	R\$ 1.280,00
Ácido Bórico p.a. (Kg)	R\$ 23,33	R\$ 18,66
Sacarose p.a. (500g)	R\$ 16,67	R\$ 141,70
Sulfato de potássio p.a. (500g)	R\$ 41,67	R\$ 1.000,08
Sulfato de amônio p.a. (500g)	R\$ 16,67	R\$ 0,17
Total		R\$ 7.647,87

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para o cálculo de gastos pela metodologia Dumas seguiu-se a ISO 14891:2002 (IDF 185:2002).⁹ A Tabela 10 apresenta os consumíveis utilizados:

Tabela 10 – Estimativa de gastos com consumíveis para realização de 1000 determinações do teor de proteínas em alimentos lácteos no IQA/LFDA-RS pelo método Dumas

Item	Valor unitário	Valor / 1000 análises
Kit de consumíveis para 1000 análises*	R\$ 14.921,32	R\$ 14.921,32
Cilindro de Hélio 6.0 (valor por m ³)	R\$ 207,11	R\$ 190,99
Cilindro de Oxigênio 6.0 (valor por m ³)	R\$ 253,51	R\$ 230,90
EDTA (frasco 100g)	R\$ 193,00	R\$ 57,90
Total		R\$ 15.401,11

Fonte: Elaborado pelo autor.

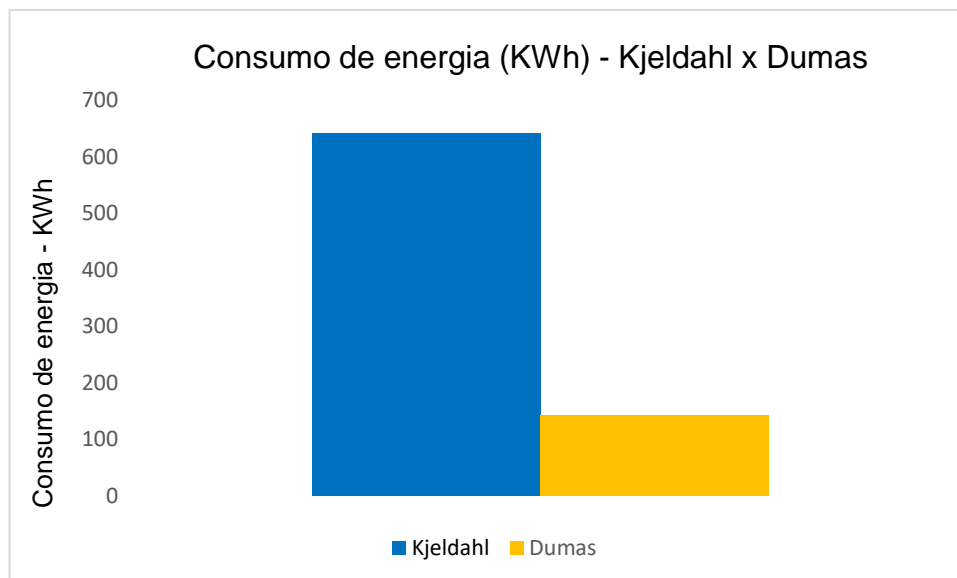
* Kit de consumíveis para 1000 análises: inclui 1 reator de combustão, 2 reatores de redução e 900g de cobre em pó, 1000 cápsulas de estanho e 10 cadinhos de cinzas.

O custo de análise do método Dumas é duas vezes (2x) mais caro do que do método Kjeldahl dada a natureza da determinação envolvendo processos de combustão e redução.

Adicionalmente estipulou-se o consumo de energia de cada equipamento baseado nas informações dos manuais de cada instrumento. O sistema completo de determinação por Kjeldahl consome 640,75 KWh de energia para 1000 determinações enquanto que o sistema Dumas consome 142,5 KWh, Figura 7. Considerando uma

taxa de R\$94,06 a cada 100KWh o método Kjeldahl tem o custo em energia de R\$602,69 para realização de 1000 determinações enquanto que pelo método Dumas esse valor é de R\$134,04, ou seja, 4,5 vezes (4,5x) menor. Essa diferença é explicada visto que o primeiro é composto de 3 módulos (*scrubber*, digestor e destilador) enquanto que o segundo engloba os fornos de combustão, redução e desgaseificação, além do autoamostrador, num único equipamento compacto.

Figura 7 – Consumo de energia para realização de 1000 determinações de teor de proteínas em alimentos lácteos pelos métodos Kjeldahl e Dumas



Fonte: Elaborado pelo autor.

7.2 PRODUTIVIDADE E AUTOSSUFICIÊNCIA

Para avaliação de tempo de análise, dedicação exclusiva do analista (necessidade de o operador realizar comandos durante o processo analítico) e impacto na produtividade da rotina laboratorial estimou-se o tempo empregado na execução de 20 análises (capacidade máxima por batelada do sistema digestor) e os dados são apresentados na Tabela 11.

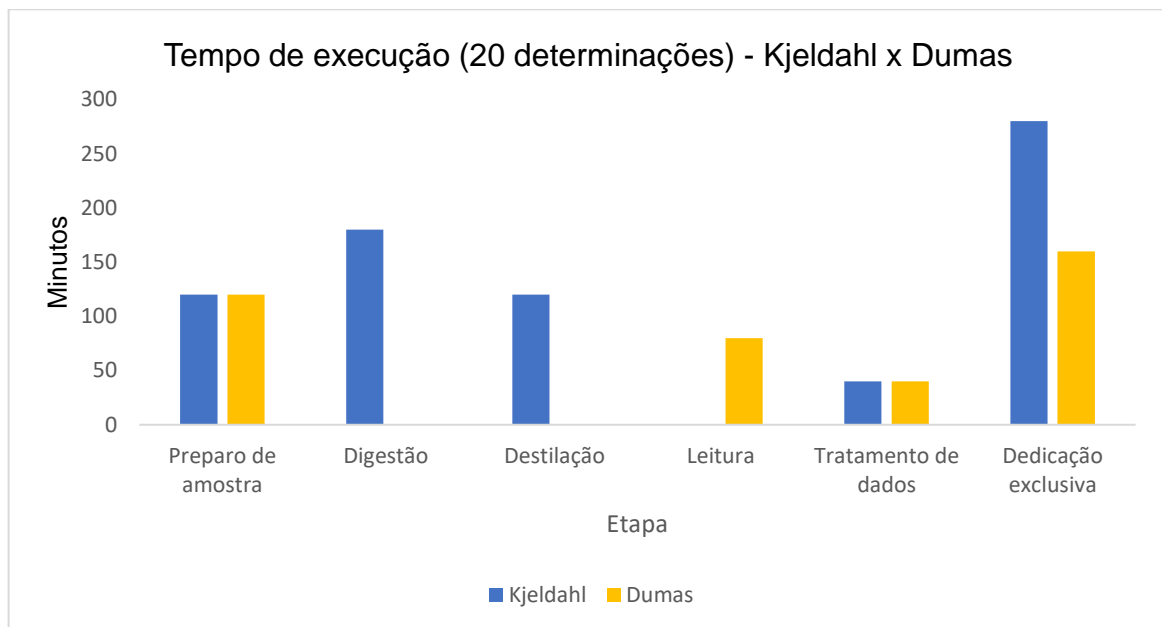
Dos 460 minutos despendidos na metodologia Kjeldahl, em 280 deles o analista deve estar presente realizando alguma atividade. Em contraponto o método Dumas, além de mais rápido, exige do analista apenas 160 minutos de dedicação exclusiva, Figura 8.

Tabela 11 – Tempo empregado em cada etapa do processo analítico nos métodos Kjeldahl e Dumas de determinação de proteínas em alimentos lácteos

Etapa	Kjeldahl	Dumas
Preparo de amostra (min)	120	120
Digestão (min)	180	-
Destilação (min)	120	-
Leitura (min)	-	80
Tratamento de dados (min)	40	40
Total	460	240

Fonte: Elaborado pelo autor.

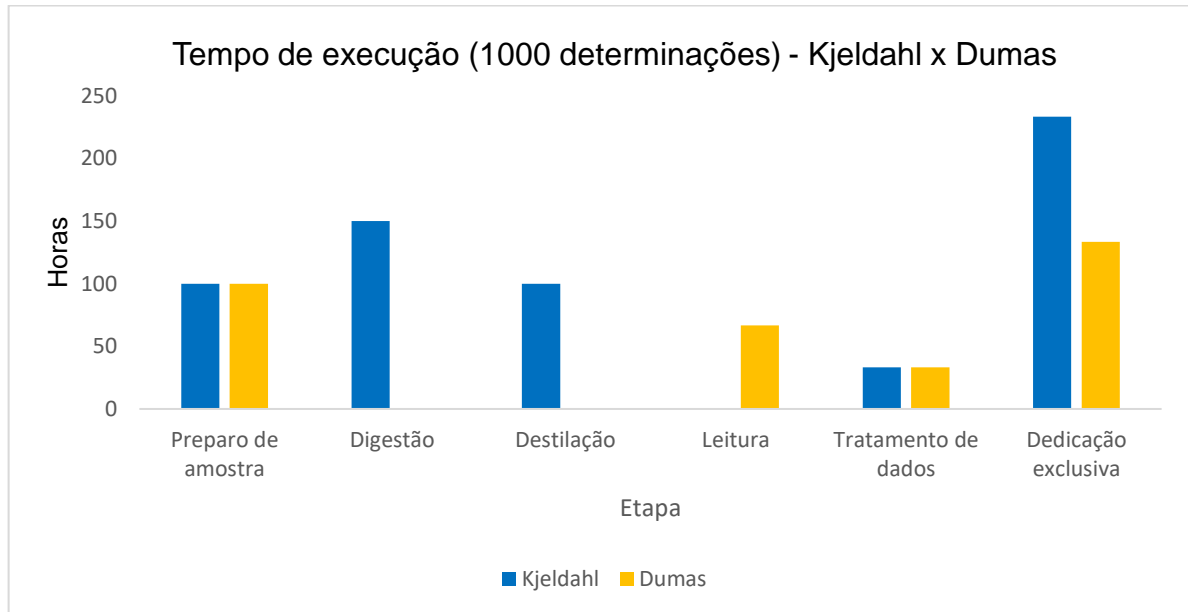
Figura 8 – Tempo de análise por etapa do processo (método Kjeldahl x Dumas) para realização de 20 determinações de teor de proteínas em alimentos lácteos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Sendo assim, estendendo a interpretação a 1000 análises, observa-se que seriam despendidas aproximadamente 383 horas de análise no método Kjeldahl, das quais 233 horas de dedicação exclusiva, enquanto que pelo método Dumas seriam 200 horas, das quais aproximadamente 133 horas de dedicação exclusiva (FIGURA 9), sendo o método validado 1,9 vezes (1,9x) mais rápido que o método de referência.

Figura 9 – Tempo de análise por etapa do processo (método Kjeldahl x Dumas) para realização de 1000 determinações de teor de proteínas em alimentos lácteos



Fonte: Elaborado pelo autor.

7.3 GERAÇÃO DE RESÍDUOS E IMPACTO AMBIENTAL

O método Dumas por tratar-se de um método de combustão sem emprego de reagentes ou solventes caracteriza-se por ser uma metodologia de baixa geração de resíduos e conseqüente pequeno impacto ambiental. Ao final de 1000 determinações o montante gerado são 10 cadinhos de cinza preenchidos com as cápsulas com as amostras que passaram pelo processo analítico, um reator de quartzo utilizado na etapa de combustão e dois reatores de quartzo preenchidos com cobre reduzido (~900 g), todos de simples descarte.

O método Kjeldahl, em contraponto, tem elevado volume de resíduos gerados, situação agravada por tratar-se de Classe de Risco 8 – Corrosivo. A cada batelada de 20 amostras digeridas e posteriormente destiladas e tituladas são gerados aproximadamente 7,5 litros de resíduo. Desta forma para 1000 determinações são gerados 375 litros a serem descartados.

Salienta-se ainda que na execução da metodologia Kjeldahl utiliza-se água para refrigeração nas etapas de digestão e destilação, somando aproximadamente 235 litros por batelada (20 determinações) e 11700 litros para realização de 1000 determinações. Em contraponto a metodologia Dumas que tem por princípio a combustão da amostra não necessita de água para refrigeração.

A substituição da metodologia de referência pelo método validado representa uma opção por um método com impacto ambiental praticamente irrisório, contribuindo também na redução de possíveis riscos associados à prática analítica em questão.

8 CONCLUSÃO

A determinação de proteínas pelo método Dumas mostra-se uma metodologia robusta conforme apresentado ao longo deste trabalho. Dados da confirmação de desempenho atendem satisfatoriamente aos parâmetros estabelecidos tanto internamente no IQA/LFDA-RS quanto na Norma Internacional ISO 14891:2002 apresentando resultados estatisticamente equivalentes à metodologia de referência.

Paralelamente à interpretação analítica dos resultados, o método avaliado mostrou sensíveis vantagens à metodologia Kjeldahl quando confrontado tempo e autossuficiência na execução das análises. Este fator minimiza o alto custo de análise dado que o ganho de produtividade com o analista envolvido menor tempo na execução da análise impacta também na rotina laboratorial possibilitando menor intervalo de tempo entre recebimento de amostras e emissão de resultados.

Soma-se ao exposto a aplicabilidade de uma metodologia com baixa geração de resíduos o que imprime, num contexto de redução de emissões e química verde, maior relevância e corrobora a decisão de implementação da metodologia em laboratórios de análises de produtos lácteos como alternativa ao método de referência.

REFERÊNCIAS

1. SANTOS, Flávia Regina dos. **Método de Lowry**: validação e estimativa do cálculo da incerteza. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2012. Disponível em: https://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/AlimentoseNutricao/Flavia_Regina_dos_Santos%20-%20ME.pdf. Acesso em: 4 abr. 2022.
2. DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
3. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2017-2018**: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101742.pdf>. Acesso em: 2 ago. 2022.
4. ORDÓÑEZ PEREDA, Juan A. Características gerais do leite e componentes fundamentais. *In*: ORDÓÑEZ PEREDA, Juan A. (org.). **Tecnologia de alimentos**: alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 2, p. 13-37.
5. RICHARDS, Neila Silvia Pereira dos Santos. Soro lácteo: perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredients**, São Paulo, v. 38, n. 17, p. 20-27, 2002.
6. CENCI, Isabella de Oliveira; GUIMARÃES, Bernardo Pontes; AMABILE, Renato Fernando; GHESTI, Grace Ferreira. Comparison between barley malt protein quantification methods. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 41, suppl. 1, p. 213-217, 2021. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/NnMfrHPnDjdp6TD9r5mFsCF/?lang=en>. Acesso em: 10 ago. 2022.
7. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Laboratórios federais de defesa agropecuária**. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/lfda>. Acesso em: 5 ago. 2022.
8. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Métodos oficiais para análise de produtos de origem animal**. Brasília, DF: MAPA, 2022. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacao-metodos-da-rede-lfda/poa/metodos_oficiais_para_analise_de_produtos_de_origem_animal_1a_ed_2022_assinado.pdf. Acesso em: 25 jul. 2022.
9. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 14891:2002**: milk and milk products : determination of nitrogen content : routine method using combustion according to the Dumas principle. Geneva: ISO, 2002.

10. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 8968-1:2014 / IDF 20-1:2014**: milk and milk products : determination of nitrogen content : part 1 : Kjeldahl principle and crude protein calculation. Geneva: ISO, 2014.
11. ZAIA, Dimas A. M.; ZAIA, Cássia Thaïs B. V.; LICHTIG, Jaim. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v. 21, n. 6, 1998.
12. GORNALL, Allan G.; BARDAWILL, Charles J.; DAVID, Maxima M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 177, n. 2, p. 751-766, 1949.
13. WILSON, Keith; WALKER, John. **Principles and techniques of biochemistry and molecular biology**. 7th ed. New York: Cambridge University Press, 2010.
14. AZEVEDO, Rita Machado da Cruz. **Estudo comparativo de métodos de doseamento de proteína em preparações de imunoglobulina humana intravenosa**. 2017. 70 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Química) – Universidade do Porto, Porto, 2017. Disponível em: <https://hdl.handle.net/10216/107959>. Acesso em: 5 ago. 2022.
15. COMPTON, Steve J.; JONES, Clive G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 151, n. 2, p. 369-374, 1985. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3). Acesso em: 4 abr. 2022.
16. GALVANI, Fábio; GAERTNER, Eliney. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. **Circular Técnica Embrapa Pantanal**, Corumbá, v. 63, p. 1-9, maio, 2006. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/37465/1/CT63.pdf>. Acesso em: 20 set. 2022.
17. ARAÚJO, Matheus Antônio. **Revisão bibliográfica**: avaliação do método de kjeldahl na determinação de nitrogênio e sua aplicação na análise foliar. 2019. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/25454>. Acesso em: 5 ago. 2022.
18. GERHARDT ANALYTICAL SYSTEMS. **Operating instructions**: Dumatherm DT N Pro. Königswinter: C. Gerhardt GmbH & Co. KG, 2018.
19. ELLISON, Stephen L. R.; BARWICK, Vicki J.; FARRANT, Trevor J. **Practical statistics for the analytical scientist**: a bench guide. 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2009.
20. PETROZZI, Sergio. **Practical instrumental analysis**: methods, quality assurance and laboratory management. Weinheim: Wiley-VCH, 2013.

21. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: DOQ-CGCRE-008 : revisão 04. jul. 2011. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf. Acesso em: 20 set. 2022.
22. VOCABULÁRIO internacional de metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012). Duque de Caxias: INMETRO, 2012.
23. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: DOQ-CGCRE-008 : revisão 08. abr. 2020. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_08.pdf. Acesso em: 25 jul. 2022.
24. GERHARDT ANALYTICAL SYSTEMS. **Product data sheet Vapodest 50s / 50s carousel**, n. 4. Königswinter: C. Gerhardt GmbH & Co. KG, 2019. Disponível em: https://www.gerhardt.de/fileadmin/Redaktion/downloads/Produktdatenblaetter/Product_data_VAPODEST_50s_carousel_english.pdf. Acesso em: 5 ago. 2022.
25. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de garantia da qualidade analítica**: para áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos. Brasília, DF: MAPA, 2015. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/manual-de-garantia-da-qualidade-analitica_2015.pdf. Acesso em: 25 jul. 2022.

APÊNDICE A – Repetibilidade e precisão intermediária

Tabela A 1 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz leite em pó no IQA/LFDA-RS

Replicata	Analista A	Analista B
	Resultado (g 100 g ⁻¹)	Resultado (g 100 g ⁻¹)
1	27,02	26,64
2	26,78	26,60
3	26,78	26,61
4	26,74	26,60
5	26,74	26,60
6	26,63	26,59
7	26,58	26,47
Média	26,75	26,59
Amplitude	0,45	0,18
Desvio	0,14	0,06
CV (%)	0,53	0,21
Equação de Horwitz		2,44
Precisão intermediária		
Média Total		26,67
Desvio Total		0,13
CV(%)		0,50

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A 2 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz leite fluido no IQA/LFDA-RS

Replicata	Analista A	Analista B
	Resultado (g 100 g ⁻¹)	Resultado (g 100 g ⁻¹)
1	3,61	3,67
2	3,59	3,61
3	3,77	3,64
4	3,69	3,56
5	3,65	3,61
6	3,62	3,61
7	3,59	3,83
Média	3,64	3,65
Amplitude	0,18	0,27
Desvio	0,06	0,09
CV (%)	1,79	2,39
Equação de Horwitz		3,29
Precisão intermediária		
Média Total		3,65
Desvio Total		0,07
CV(%)		2,03

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A 3 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz doce de leite pastoso no IQA/LFDA-RS

Replicata	Analista A Resultado (g 100 g⁻¹)	Analista B Resultado (g 100 g⁻¹)
1	5,65	5,54
2	5,52	5,49
3	5,67	5,47
4	5,53	5,48
5	5,52	5,51
6	5,47	5,43
7	5,47	5,45
Média	5,55	5,48
Amplitude	0,20	0,11
Desvio	0,08	0,04
CV (%)	1,46	0,67
Equação de Horwitz		3,09
Precisão intermediária		
Média Total		5,51
Desvio Total		0,07
CV(%)		1,26

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A 4 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz caseinato no IQA/LFDA-RS

Replicata	Analista A Resultado (g 100 g⁻¹)	Analista B Resultado (g 100 g⁻¹)
1	86,93	87,04
2	87,04	87,44
3	86,86	87,40
4	86,92	87,68
5	86,89	87,39
6	87,20	87,63
7	87,32	87,75
Média	87,02	87,48
Amplitude	0,46	0,71
Desvio	0,17	0,24
CV (%)	0,20	0,27
Equação de Horwitz		2,04
Precisão intermediária		
Média Total		87,25
Desvio Total		0,31
CV(%)		0,35

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A 5 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz leite condensado no IQA/LFDA-RS

Replicata	Analista A Resultado (g 100 g ⁻¹)	Analista B Resultado (g 100 g ⁻¹)
1	8,03	7,80
2	7,98	7,71
3	8,03	7,80
4	7,98	7,77
5	8,01	7,74
6	8,02	7,79
7	8,00	7,71
Média	8,00	7,76
Amplitude	0,05	0,10
Desvio	0,02	0,04
CV (%)	0,26	0,54
Equação de Horwitz		2,93
Precisão intermediária		
Média Total		7,88
Desvio Total		0,13
CV(%)		1,66

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela A 6 – Resultados do estudo de repetibilidade e precisão intermediária para as determinações de teor de proteínas para a matriz doce de leite sólido no IQA/LFDA-RS

Replicata	Analista A Resultado (g 100 g ⁻¹)	Analista B Resultado (g 100 g ⁻¹)
1	8,20	8,43
2	8,21	8,29
3	8,22	8,27
4	8,21	8,23
5	8,25	8,28
6	8,23	8,24
7	8,21	8,22
Média	8,22	8,28
Amplitude	0,05	0,21
Desvio	0,02	0,07
CV (%)	0,20	0,86
Equação de Horwitz		2,91
Precisão intermediária		
Média Total		8,25
Desvio Total		0,06
CV(%)		0,72

Fonte: Elaborado pelo autor.