KHAUAN MARÇON ENGLHARDT BARBOSA

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM RAÇÃO PARA ANIMAIS

Assis/SP

2017



KHAUAN MARÇON ENGLHARDT BARBOSA

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM RAÇÃO ANIMAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Bacharel em Química Industrial do Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis – IMESA e a Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA, como requisito parcial à obtenção do Certificado de Conclusão.

Orientando(a): Khauan Marçon Englhardt Barbosa Orientador(a): Me. Alexandre V. Guedes Mazalli

Assis/SP

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

BARBOSA, Khauan Marçon Englhardt Barbosa.

Determinação de proteínas em ração animal / Khauan Marçon Englhardt Barbosa. Fundação Educacional do Município de Assis –FEMA – Assis, 2017. 50p.

Orientador: Me. Alexandre V. Guedes Mazalli

Trabalho de Conclusão de Curso (Química) – Fundação Educacional do Município de Assis – FEMA

1. Proteínas. 2. Ração animal.

CDD: 660

Biblioteca da FEMA

DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS EM RAÇÃO ANIMAL

KHAUAN MARÇON ENGLHARDT BARBOSA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis, como requisito do Curso de Graduação, avaliado pela seguinte comissão examinadora:

Orientador: Me. Alexandre V. Guedes Mazalli

Analisadora: Me. Elaine Amorim Soares

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha amada esposa.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, a minha família, esposa e a todos os professores que me ajudaram me dando todo conhecimento necessário para que este trabalho fosse feito; todas as pessoas que contribuíram para realização da parte experimental do mesmo; e principalmente a disposição dos estagiários e técnicos do laboratório CEPECI que me ajudaram e contribuíram na conclusão deste trabalho.

RESUMO

É possível perceber o grande aumento nos cuidados com os animais de estimação nos últimos anos. E com esse crescimento inúmeras marcas e tipos de produtos para alimentação animal tem surgidos todos os dias no mercado. Essa demanda surgiu com a busca dos consumidores em encontrar produtos com as características que mais combinasse com o seu perfil de compra e consumo. E essa variedade de marcas e perfis de alimentos para animais podem variar muito de um para outro. O objetivo desse trabalho foi analisar a teor de proteína e umidade de 10 marcas de ração para cães adultos do tipo Premium através dos métodos Dumas, Kjeldahl e por espectroscopia no infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIR). As análises foram feitas em triplicatas e tiveram resultados satisfatórios em todas as marcas. O valor encontrado nas análises demonstra que os fabricantes estão cumprindo com as informações contidas na embalagem de seus respectivos produtos, mostrando que podem atender esse mercado exigente entregando um produto com a qualidade esperada pelos seus consumidores.

Palavras-chave: Proteínas, Ração animal.

ABSTRACT

You can see the huge increase in pet care in recent years. And with this growth numerous brands and types of products for animal feed have arisen every day in the market. This demand arose with the search of the consumers in finding products with the characteristics that most match with their profile of purchase and consumption. And that variety of brands and feed profiles can vary greatly from one to another. The objective of this work was to analyze the protein and moisture content of 10 feed brands for adult Premium dogs using Dumas, Kjeldahl and Fourier transform near infrared spectroscopy (FT-NIR). The analyzes were done in triplicates and had satisfactory results in all brands. The value found in the analyzes demonstrates that manufacturers are complying with the information contained in the packaging of their respective products, showing that they can meet this demanding market by delivering a product with the quality expected by its consumers.

Keyword: Proteins, Animal feed.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Os 20 Aminoácidos primários das proteínas	20
Figura 2: Formação de uma ligação peptídica	21
Figura 3: Deslocalização dos elétrons na ligação peptídica	21
Figura 4: Planaridade em torno da ligação peptídica	22
Figura 5: Aspartame	22
Figura 6: Níveis estruturais nas proteínas	23
Figura 7: Estrutura primária das proteínas	24
Figura 8: Hélice α	25
Figura 9: Ligações de hidrogênio nas folhas pregueadas β	25
Figura 10: Interações estabilizantes da estrutura terciária	26
Figura 11: Ligações dissulfeto	27
Figura 12: Hemoglobina	28
Figura 13: Resultado do tesde de biureto	31
Figura 14: Formação do biureto	33
Figura 15: Interação entre o íon cúprico e as cadeias proteicas	34
Figura 16: Amostras de ração para cachorro antes de serem trituradas	36
Figura 17: Amostras de ração para cachorro trituradas	36
Figura 18: Analisador de Proteína marca LECO, modelo FP-528	38
Figura 19: Analisador Antaris II FT-NIR da marca ThermoNicolet	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores nutricionais em alimentos completos para cães em	
crescimento	15
Tabela 2: Valores nutricionais em alimentos completos para cães adultos	15
Tabela 3: Valores nutricionais em alimentos completos para gatos em	
crescimento	16
Tabela 4: Valores nutricionais em alimentos completos para gatos adultos	16
Tabela 5: Valores nutricionais em alimentos especiais para cães e gatos	17
Tabela 6: Valores nutricionais em alimentos completos para cães adultos	17
Tabela 7: Resultados obtidos no método Dumas	40
Tabela 8: Resultados obtidos no método FT-NIR	41
Tabela 9: Resultados obtidos no método Kjeldahl	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 RAÇÃO ANIMAL	14
3 PROTEÍNAS	18
3.1 AMINOÁCIDOS	19
3.2 LIGAÇÕES PEPTÍDICAS	21
3.3 PEPTÍDEOS	22
3.4 ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS	23
3.4.1 Estrutura primária	23
3.4.2 Estrutura secundária	24
3.5.2.1 Hélice α	24
3.5.2.2 Folha pregueada β	25
3.5.3 Estrutura terciária	26
3.5.3.1 Ligação de dissulfeto	26
3.5.4 Estrutura quaternária	27
4 TESTE DE BIURETO: UMA ALTERNATIVA PARA A	
CONTEXTUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO ENSINO MÉDIO	29
4.1 MATERIAIS E REAGENTES	30
4.2 PROCEDIMENTO	31
5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS	32
5.1 MÉTODO DE KJELDAHL	32
5.1.1 Digestão	32
5.1.2 Destilação	32
5.1.3 Titulação	33

5.2 MÉTODO DE BIURETO	33
5.3 MÉTODO DE LOWRY	34
5.4 MÉTODO DE DUMAS	34
5.5 MÉTODO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-NIR)	35
6. MATERIAIS E MÉTODOS	36
6.1 MATERIAIS	36
6.1.1 Amostras	36
6.1.2 Equipamentos	37
6.1.3 Materiais e reagentes	37
6.2 MÉTODOS	38
6.2.1 Análise de proteína pelo método Dumas	38
6.2.2 Análise de proteína por espectroscopia no infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIR)	39
6.2.3 Análise de proteína pelo método Kjeldahl	
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
8 CONCLUSÃO	44
9 REFERÊNCIAS	45

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem a quarta maior população de animais de estimação, com um total de 132,4 milhões dos 1,56 bilhão da população mundial, segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação e com um faturamento de 18 bilhões no mercado de pet nacional (ABINPET, 2015).

No mundo todo há uma explosão no número de marcas de rações animais, com formulações cada vez mais sofisticadas e específicas, em relação aos nutrientes adicionados (STEIFF & BAUER, 2001). Segundo SILVA & QUEIROZ (2002), nutrientes são substâncias necessárias ao organismo, atendendo às exigências para produção animal, seja na forma de carne, leite, lã ou outro produto de interesse ao homem. Dentre os nutrientes estão presentes: água, carboidratos, proteínas, lipídios, minerais e vitaminas, todos estes contidos na matéria seca do alimento.

A evolução dos hábitos em favor dos alimentos industriais está associada a um conjunto de fatores como: alimentação sadia, equilibrada, com grande variedade de produtos disponíveis no mercado e, principalmente, a praticidade (PETBR, 2003). Sendo assim, uma elevada competitividade surgiu no mercado, o que tem levado à segmentação de produtos que apresentam padrões comerciais e nutricionais distintos. As empresas, de um lado, têm desenvolvido produtos específicos, com o intuito de chamar a atenção do consumidor para um produto diferenciado e de elevado valor nutricional, com isso apresentando maior custo (ROBINSON & LI, 1997). Estes apresentam formulação mais sofisticada, com ingredientes selecionados e melhor processamento.

Os proprietários começaram a escolher entre aqueles que, além de nutricionalmente balanceados, oferecessem vantagem adicionais como: palatabilidade, qualidade de matéria prima, ausência de aditivos e corantes alimentícios. Para atender a estes consumidores, surgiram os alimentos diferenciados, denominados Premium e Superpremium (BORGES, 1998).

Por outro lado, também são produzidos alimentos econômicos, de baixo valor agregado e que competem no mercado apenas por preço, sendo formulados com ingredientes mais baratos. Desta forma, é possível que talvez os valores nutricionais apresentados não sejam condizentes ao que realmente possui o produto. Diante do exposto, o presente trabalho tem por objetivo determinar a quantidade de proteína total em rações comercias e verificar se

as quantidades de proteína e umidade apresentadas nos rótulos são de fato encontradas no produto.

2. RAÇÃO ANIMAL

De acordo com o decreto nº 6.296, de 11 de dezembro de 2007, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no parágrafo XIV "produto destinado à alimentação animal é uma substância ou mistura de substâncias, elaborada, semielaborada ou bruta que se emprega na alimentação de animais". Essa mistura normalmente é formada de farelo de soja, farelo de glúten de milho, farinha de carne ou ossos e farinha de vísceras de frango. Depois as rações são processadas nas fábricas por extrusoras e durante esse processo, a ração recebe água quente ou vapor com pressão e temperatura para que seja extrusada e receba o formato final conforme os moldes utilizados. No final ela recebe uma pulverização com gordura animal para que adquira sabor agradável ao paladar (BELLAVER, 1998).

Segundo o MAPA, os alimentos para animais de companhia podem ser classificados como alimentos completos, produtos capazes de atender integralmente as exigências nutricionais dos animais de companhia, podendo possuir propriedades específicas ou funcionais e alimentos coadjuvantes, produtos capazes de atender integralmente as exigências nutricionais dos animais de companhia com distúrbios fisiológicos ou metabólicos, cuja formulação é incondicionalmente privada de qualquer agente farmacológico ativo.

A Instrução Normativa SARC (Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) nº 9, de 9 de julho de 2003, aprova o Regulamento Técnico sobre fixação de Padrões de Identidade Qualidade de Alimentos Completos e de Alimentos Especiais destinados a cães e gatos, fixando a identidade e as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os alimentos completos e os alimentos especiais, destinados aos cães e gatos:

Sendo alimentos completos aqueles alimentos que garantam todos os níveis nutricionais necessários à correta alimentação diária de cães e gatos saudáveis e alimentos especiais os alimentos específicos ou os alimentos coadjuvantes especialmente formulados ou processados e que possuam as seguintes propriedades nutricionais: para os alimentos específicos, valor energético e seu conteúdo de proteínas, extrato etéreo, carboidratos, matéria fibrosa, vitaminas e minerais e para os alimentos coadjuvantes, valor energético e seu conteúdo de proteínas, extrato etéreo, carboidratos, matéria fibrosa, vitaminas e minerais destinados a cães e gatos com distúrbios fisiológicos ou metabólicos, cuja formulação é incondicionalmente privada de qualquer agente farmacologicamente ativo.

As tabelas 1, 2, 3, 4 e 5 mostram os níveis de garantia aceitáveis de umidade e proteína para raçoes destinadas à diferentes estágios de crescimento conforme a IN n°9 de 2003.

Níveis de garantia (%)	Cães em crescimento				
	Alimento seco	Alimento semiúmido	Alimento úmido		
Umidade (máx.)	12,0	30,0	84,0		
Proteína bruta (mín.)	22,0	18,0	4,0		

Tabela 1: Valores nutricionais em alimentos completos para cães em crescimento. (In: Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003.

Níveis de garantia (%)	Cães adultos				
	Alimento seco	Alimento semiúmido	Alimento úmido		
Umidade (máx.)	12,0	30,0	84,0		
Proteína bruta (mín.)	16,0	13,0	3,0		

Tabela 2: Valores nutricionais em alimentos completos para cães adultos. (In: Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003).

Níveis de garantia (%)	Gatos em crescimento				
	Alimento seco	Alimento semiúmido	Alimento úmido		
Umidade (máx.)	12,0	30,0	84,0		
Proteína bruta (mín.)	28,0	23,0	5,3		

Tabela 3: Valores nutricionais em alimentos completos para gatos em crescimento. (In: Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003).

Níveis de garantia (%)	Gatos adultos				
	Alimento seco	Alimento semiúmido	Alimento úmido		
Umidade (máx.)	12,0	30,0	84,0		
Proteína bruta (mín.)	24,0	19,0	4,4		

Tabela 4: Valores nutricionais em alimentos completos para gatos adultos. (In: Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003).

Níveis de garantia (%)		nento eco		nento úmido		nento nido	Alim líqu	ento iido
	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos	Cães	Gatos
Umidade (máx.)	12,0	12,0	30,0	30,0	84,0	84,0	95,0	95,0
Proteína bruta (mín.)	7,0	24,0	5,6	19,0	1,3	4,4	0,4	1,4

Tabela 5: Valores nutricionais em alimentos especiais para cães e gatos. (In: Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003).

Níveis de garantia (%)	Cães adultos				
The order of the same (70)	Alimento seco	Alimento semiúmido	Alimento úmido		
Umidade (máx.)	12,0	30,0	84,0		
Proteína bruta (mín.)	16,0	13,0	3,0		
Extrato etéreo	4,5	3,6	1,0		
Matéria fibrosa (máx.)	6,5	5,2	2,0		
Matéria mineral (máx.)	12,0	10,0	2,5		
Cálcio	2,4	2,0	0,4		
Fósforo	0,6	0,5	0,1		

Tabela 6: Valores nutricionais em alimentos completos para cães adultos. (In: Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003).

3. PROTEÍNAS

As proteínas são macromoléculas constituídas de aminoácidos unidos por ligações peptídicas, sendo então absorvidas no tubo digestivo como aminoácidos (HERMANN, 1995). Assim, as proteínas ao serem digeridas, fornecerão ao organismo os aminoácidos que, por sua vez, vão compor as proteínas (LEHNINGER, 2002) que o cão e gato necessitam para proporcionar a síntese de substâncias celulares como as próprias proteínas de constituição, permitindo a síntese das proteínas das produções, entendidas como: crescimento, leite, pelos, pele e ossos, síntese de substâncias necessárias para a manutenção dos processos orgânicos vitais, tais como enzimas e hormônios, síntese de substâncias biologicamente importantes para o metabolismo (ANDRIGUETTO et al., 2002). Bem como participar de mecanismos de desintoxicação, síntese de substâncias fundamentais para a transmissão dos caracteres hereditários através do DNA e RNA, desempenhar função de proteção ao organismo contra agressões infecciosas ou tóxicas, ao formarem os anticorpos capazes de reagirem com os agentes agressores, regulação do metabolismo da água, nas trocas hídricas entre os tecidos e o plasma, função de transporte de alguns nutrientes (LEHNINGER, 2002).

Segundo BLANCO & BRESSANI 1991, a qualidade da proteína refere-se à sua capacidade de satisfazer os requerimentos nutricionais do homem por aminoácidos essenciais e nitrogênio não-essencial, para fins de síntese proteica. Elas possuem um papel fundamental na fisiologia e constituição corporal (GENTON, MELZER & PICHARDT, 2010), sendo que a deficiência e ou excesso deste nutriente pode acarretar sérios problemas ao cão e ao gato, alguns fatais, cerca de 50% das células são constituídas por proteínas e um cão possui cerca de 60% do seu peso (em matéria seca) representado por esta substância, a maioria localizada nos músculos (MILLWARD, 1989).

Cães exigem altos níveis dietéticos de proteína, mínimo de 18% para cães adultos e de 22% para filhotes (AAFCO, 2003). Quando a dieta oferecida possui níveis mais baixos que o exigido, o metabolismo dos animais é comprometido e o desenvolvimento afetado; há uma redução de peso por consequência da degradação da proteína tecidual para a manutenção do metabolismo basal (MILLWARD, 1989). Entretanto, quando a proteína da dieta está acima do exigido, apenas o necessário será absorvido e o excesso será eliminado (STEFFENS, 1989). A retenção de proteína corporal está diretamente associada

à idade do animal e sua capacidade de crescimento, ou seja, animais jovens em fase de crescimento acelerado depositam mais proteína e, consequentemente, tem maiores exigências e animais adultos com crescimento mais lento ou estabilizado possuem maior predisposição para depositar gordura, assim menor exigência proteica (VERSTEGEN & JONGBLOED, 2003).

3.1 AMINOÁCIDOS

Os aminoácidos são moléculas orgânicas que servem como unidade fundamental na formação de proteínas. Em sua estrutura molecular é encontrado sempre um carbono central (C), chamado de alfa (α), ligado a um hidrogênio (H), a um grupo carboxila (COOH), a um grupo amina (NH₂) e a um radical (R), que muda de aminoácido para aminoácido. É esse radical que determinará as características de um aminoácido e o diferirá um do outro (LEHNINGER, 2002).

Existem dezenas de tipos de aminoácidos na natureza, mas apenas vinte aparecem no código genético, os quais são denominados principais e alguns especiais que só aparecem em algumas proteínas. Dos vinte principais que formam as proteínas, dividimos em aminoácidos não essenciais, que são os capazes de ser sintetizados no organismo; e aminoácidos essenciais, que são aqueles que não são produzidos no organismo, sendo necessária a ingestão de determinados alimentos (Figura 1), são eles: triptofano, valina, fenilalanina, treonina, lisina, isoleucina, leucina, histidina e metionina (LEHNINGER, 2002). A maioria deles é encontrado em alimentos de origem animal: carne, leite, ovos, etc. Apesar dos vegetais conseguirem sintetizar todos os tipos de aminoácidos necessários para sobrevivência, não são encontrados todos os essenciais em um só vegetal. Existem ainda os aminoácidos essenciais ocasionais, o que significa que são produzidos por organismos saudáveis, mas em determinadas situações de patologias, podem não ser produzidos. São eles: cisteína, glicina, prolina e tirosina. Os aminoácidos podem ainda sofrer outras divisões, segundo o radical de cada um deles (MARZZOCO & TORRES, 1999).

Nos aminoácidos apolares o grupo (R) é uma cadeia lateral apolar, ou seja, são hidrofóbicos. É o caso da alanina, leucina, valina, cisteína, glicina, prolina, isoleucina, metionanina, triptofano e fenilalanina. Nos aminoácidos polares neutros: o grupo (R) é uma cadeia lateral polar sem carga elétrica, ou seja, neutra. São hidrofílicos e geralmente contêm hidroxilias, sulfidrilas e aminas. São os: Glicina, Serina, Treonina, Cisteína, Tirosina,

Asparagina e Glutamina. Nos aminoácidos polares ácidos: São hidrofílicos e o grupo (R) é uma cadeia lateral com carga negativa, normalmente possuem grupo carboxila, além daquela da estrutura geral. É o ácido glutâmico e ácido aspártico. Aminoácidos polares básicos: São hidrofílicos e o grupo (R) é uma cadeia lateral básica, carregada positivamente, possuem grupo amino. São eles: Histidina, lisina e arginina (LEHNINGER, 2002).

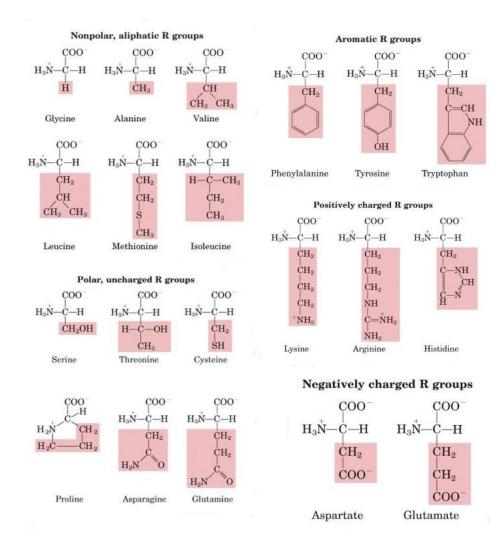


Figura 1: Os 20 aminoácidos primários das proteínas. (In: LEHNINGER, 2002, 92 p.)

3.2 LIGAÇÕES PEPTÍDICAS

Quando duas moléculas de aminoácido se unem elas sofrem uma reação de condensação formando uma ligação amida (Figura 2). O produto desta união é denominado peptídeo, e a ligação amida ganha um nome especial de ligação peptídica (NELSON, 2011).

Figura 2: Formação de uma ligação peptídica. (In: NELSON, 2011. Pg. 82).

A ligação peptídica apresenta deslocalização de elétrons entre o nitrogênio da amida e sua carbonila, dando 40% de caráter de dupla a esta ligação. O caráter parcial de dupla da ligação peptídica faz com que a rotação livre em torno desta não seja possível. Já impedimento estérico faz com que a configuração *trans* seja mais estável que a *cis*, os seja, os carbonos α-carbonílicos dos aminoácidos adjacentes são *trans* um em relação ao outro, conforme mostrado na Figura 3. Estes carbonos α (Figura 4), juntamente com a carbonila e o nitrogênio estão num plano rígido, e esta planaridade afeta a maneira como a cadeia de aminoácidos num peptídeo ou proteína pode se dobrar, influenciando a sua forma tridimensional (BRUICE, 2006).

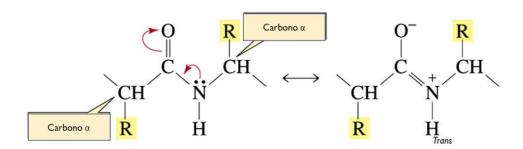


Figura 3: Deslocalização dos elétrons na ligação peptídica. (In: BRUICE, 2006. Pg. 388).

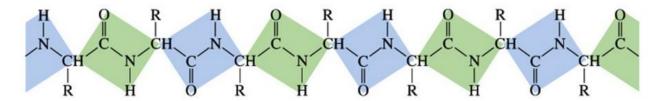


Figura 4: Planaridade em torno da ligação peptídica. (In: BRUICE, 2006. Pg. 388).

3.3 PEPTÍDEOS

Dois aminoácidos ligados formam um dipeptídeo. Três um tripeptídeo, quatro um tetrapeptídeo, cinco um pentapeptídeo, e assim por diante. Poucos aminoácidos unidos formam um oligopeptídeo, muitos aminoácidos unidos formam um polipeptídeo. A diferença entre um polipeptídeo e uma proteína é a massa molecular. Com uma massa molecular abaixo de 10.000 temos um polipeptídeo, acima de 10.000 temos uma proteína. Não existe correlação entre o comprimento de um peptídeo e sua atividade biológica. Peptídeos de ocorrência natural podem variar em comprimento de dois a muitas centenas de resíduos de aminoácidos, mas mesmo os menores peptídeos podem apresentar importantes efeitos biológicos. Um exemplo de dipeptídeo sintetizado comercialmente é o éster metílico L-aspartil-L-fenilalanina, mais conhecido como aspartame. Sua estrutura é extremamente simples, mas possui um poder adoçante 200 vezes superior a D-glicose, sendo utilizado em diversos produtos diet e light (NELSON, 2011).

$$\begin{array}{c} \text{COO}^- \\ \text{CH}_2 \text{ O} \\ \text{CH}_2 \text{ O} \\ \text{CH}_2 \text{ O} \\ \text{H}_3 \text{N-CH-C-N-CH-C-OCH}_3 \\ \text{H} \end{array}$$

Figura 5: Aspartame. (In: NELSON, 2011. Pg. 83).

3.4 ESTRUTURAS DAS PROTEÍNAS

As moléculas de proteínas apresentam vários níveis de estrutura (Figura 6). A estrutura primária é a descrição de todas as ligações covalentes presentes na proteína, em particular a sequência de aminoácidos e a posição de todas as ligações dissulfeto. A estrutura secundária descreve arranjos de aminoácidos particularmente estáveis, o que determina a conformação regular assumida pelos segmentos proteicos. A estrutura terciária descreve toda a estrutura tridimensional da cadeia peptídica. A estrutura quaternária descreve como cadeias peptídicas individuais estão arranjadas umas em relação as outras numa proteína. Apenas proteínas com mais de uma cadeia peptídica possuem estrutura quaternária (NELSON, 2011).

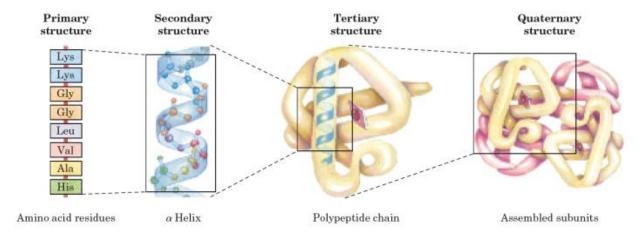


Figura 6: Níveis estruturais nas proteínas. (In: NELSON, 2011. Pg. 89).

3.4.1 Estrutura primária

A estrutura primária (Figura 7) é o conjunto de todas as ligações covalentes presentes no peptídeo ou na proteína. Isso inclui as ligações peptídicas e as ligações dissulfeto. Para determinar a ordem ou sequência dos aminoácidos é necessário antes romper as ligações dissulfeto, o que pode ser conseguido através de uma oxidação ou de uma redução. O elemento mais importante na estrutura primária é a sequência de resíduos de aminoácidos (NELSON, 2011).



Figura 7: Estrutura primária das proteínas. (In: NELSON, 2011. Pg. 89).

3.4.2 Estrutura secundária

A estrutura secundária de um peptídeo ou proteína nos diz a conformação adquirida por um segmento proteico de forma a minimizar a sua energia. Não fossem as cadeias laterais, a conformação mais estável seria a completamente estendida, onde todos os átomos da cadeia principal encontram-se em conformação antiperiplanar, minimizando assim a repulsão e a energia. Entretanto, a repulsão ou atração entre as cadeias laterais exercem grande influência na conformação assumida pela molécula (NELSON, 2011).

3.4.2.1 Hélice α

As ligações de hidrogênio exercem grande influência na orientação dos grupos polares nas ligações peptídicas. Para maximizar a força das ligações de hidrogênio, o arranjo mais simples que a cadeia peptídica pode assumir é o da hélice α , como na Figura 8 (BRUICE, 2006).

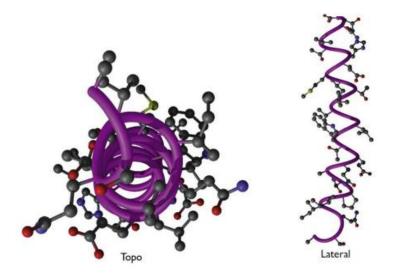


Figura 8: Hélice α. (In: BRUICE, 2006. Pg. 403).

3.4.2.2 Folha pregueada β.

O segundo tipo de estrutura secundária mais comum são as folhas pregueadas β. Esta é uma estrutura totalmente estendida em zig-zag (Figura 9) e só não é a mais estável devido às cadeias laterais dos aminoácidos. Os aminoácidos que a forma não causam impedimento estérico, permitindo que as ligações de hidrogênio ocorram entre as cadeias peptídicas vizinhas, estabilizando a estrutura (BRUICE, 2006).

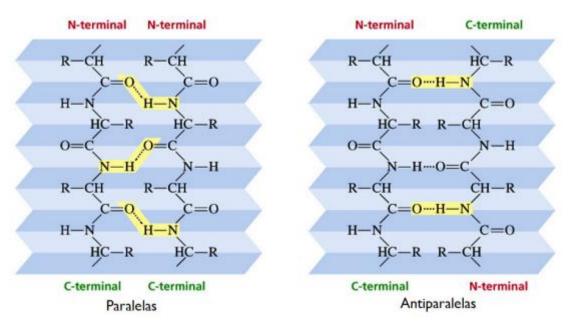


Figura 9: Ligações de hidrogênio nas folhas pregueadas β. (In: BRUICE, 2006. Pg. 404).

3.5.3 Estrutura terciária

A estrutura terciária de uma proteína ou peptídeo é o arranjo tridimensional de toda a cadeia peptídica (Figura10). As proteínas se dobram espontaneamente quando em solução para minimizar a sua energia, maximizando a sua estabilidade. O que mantém a estrutura dobrada são as interações estabilizantes. Estas podem ser ligações covalentes, onde predominam as ligações dissulfeto, mas outros tipos de ligações covalentes entre as cadeias laterais dos aminoácidos ocasionalmente também ocorrem. Além das ligações covalentes ocorrem pares iônicos entre os aminoácidos com cadeia lateral positiva e os aminoácidos com cadeia lateral negativa, ligações de hidrogênio entre aminoácidos e interações hidrofóbicas do tipo força de Van der Waals entre aminoácidos apolares (BRUICE, 2006).

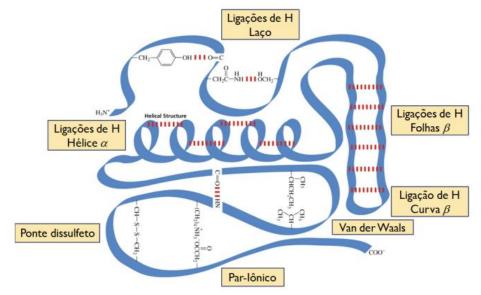


Figura 10: Interações estabilizantes da estrutura terciária. (In: BRUICE, 2006. Pg. 406).

3.5.3.1 Ligação de dissulfeto

Juntamente com as ligações peptídicas, as ligações dissulfeto são as únicas ligações covalentes que mantém os aminoácidos ligados em um peptídeo ou proteína. Mas ao contrário das ligações peptídicas, as ligações dissulfeto se formam entre aminoácidos não adjacentes, contribuindo com a forma como a proteína ou peptídeo se dobra (NELSON, 2011).

Figura 11: Ligações dissulfeto. (In: NELSON, 2011. Pg. 77).

Os tióis ao serem oxidados formam dissulfetos, substâncias com ligação S-S. Se a oxidação forma dissulfetos, a redução retorna aos tióis. Nos peptídeos e proteínas, o aminoácido que apresenta um grupo tiol é a cisteína. Quando dois resíduos de cisteína não adjacentes são oxidados eles formam um dissulfeto denominado cistina (BRUICE, 2006), ilustrado na Figura 11.

3.5.4 Estrutura quaternária

Algumas vezes uma proteína pode ter mais de uma cadeia peptídica separada. Nestes casos a proteína apresenta estrutura quaternária. O número de cadeias peptídicas pode variar de duas a centenas. A maneira como essas cadeias estão arranjadas e interagem umas com as outras é chamado de estrutura quaternária (NELSON, 2011). Um exemplo de estrutura quaternária é a hemoglobina (Figura 12).

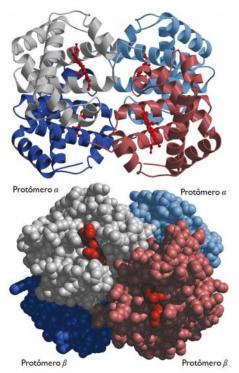


Figura 12: Hemoglobina. (In: NELSON, 2011. Pg. 139)

4. TESTE DE BIURETO: UMA ALTERNATIVA PARA A CONTEXTUALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS NO ENSINO MÉDIO

Química é a ciência que estuda a transformação da matéria, a energia consumida ou produzida na transformação, bem como a estrutura da matéria (CHRISPINO, 1991). Seu aprendizado leva à formação humana e amplia as fronteiras culturais proporcionando ao aluno uma maior autonomia, para que assim, consiga interpretar as ações cotidianas através dos métodos em que o conhecimento foi transmitido (CAMPOS, 2012).

A utilização de tendências teóricas em demasia e a falta de práticas e experimentações no método de ensino tem sido as maiores características do Ensino Médio, mesmo que desde 1930 as legislações educacionais já propunham que os ensinos de Química devessem conter preceitos de métodos experimentais (SOUZA, 2011).

Grande parte dos alunos demostram falta de percepção e importância daquilo que estudam no Ensino de Química, pois, o que é ministrado não desperta o seu interesse (PONTES et al., 2008). Assim, os experimentos podem ser excelentes estratégias para a criação de problemas do cotidiano que estimulem os alunos a criarem questionamentos investigativos, a ilustrar princípios, desenvolver atividades práticas, testar hipóteses ou investigações, o que ajuda o mesmo de fato a aprender (GUIMARÃES, 2009).

Nas rações animais são encontradas proteínas responsáveis pelo crescimento, pêlos, pele e ossos, síntese de substâncias necessárias para a manutenção dos processos orgânicos vitais, tais como enzimas e hormônios, síntese de substâncias biologicamente importantes para o metabolismo e que também estão no dia-a-dia do aluno. Presentes em alimentos ingeridos diariamente, como por exemplo, o milho.

O enfoque seria na detecção de proteínas em alimentos presentes no seu cotidiano através do teste de biureto em aula prática em laboratório.

Como estratégia de ensino, os alunos seriam esclarecidos sobre os componentes que formulam a ração animal, depois, seria trabalhado o tema Proteínas em sala de aula, levando em consideração aspectos como: o que são proteínas; classificações (aminoácidos, peptídeos, tipos de ligações envolvidas, tipos de estruturas das proteínas);

e a relação das proteínas com a saúde (como fonte de aminoácidos e síntese de substâncias biologicamente importantes para o metabolismo).

O tema Proteínas pode ser aplicado no 3º ano do Ensino Médio, onde, são abordados conteúdos voltados para a Química Orgânica.

Através da realização de um experimento em laboratório que verifica a presença de proteínas em alimentos, pretendendo-se suscitar a discussão sobre síntese de proteínas e a composição proteica dos alimentos. O teste do biureto é um método laboratorial, utilizado para a determinação de proteínas totais numa amostra. Os reagentes do teste formam um complexo com a ligação peptídica, evidenciado pela coloração violeta. A intensidade da cor é proporcional ao número de ligações peptídicas existentes. No experimento, trabalharemos com a percepção visual, comparando as amostras com os controles positivo (clara de ovo) e negativo (água).

Os alunos serão separados em grupos e cada grupo deverá preparar quatro tubos: um com água, dois com a solução do alimento preparado e um com clara de ovo. E após acrescentar 5 gotas de CuSO₄ a 1% e NaOH 10%, comparar os tons de violeta obtidos para discussão de qual os alimentos com maior fonte proteica

4.1 MATERIAS E REAGENTES

- Tubos de ensaio:
- Liquidificador com estrutura coadora;
- Solução de sulfato de cobre (CuSO₄) a 1% (1 g para 100 mL de água);
- Solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 10% (10 g para 100 mL de água);
- Pipetas volumétricas de vidro ou plástico (ou conta-gotas);
- Água (controle negativo);
- Clara de ovo crua (controle positivo);
- Soja crua em grãos;
- Pão francês:
- Arroz cozido:

- Feijão cozido;
- Farinha de mandioca torrada;
- Gelatina incolor em pó e sem sabor;
- Leite integral.

4.2 PROCEDIMENTO

Triturar as amostras no liquidificador com a adição de 100 mL de água. Acrescentar 5 gotas de CuSO₄ a 1% aos tubos e depois com uma pipeta limpa ou nova, colocar 5 gotas de NaOH 10%. Agitar suavemente para permitir a mistura dos líquidos e observar os resultados.



Figura 13: Resultados do teste de biureto.

5. MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS

5.1 MÉTODO DE KJELDAHL

Proposto por Kjeldahl em 1883, a determinação do nitrogênio total (NT) ainda é muito usada por ser uma técnica confiável, com rotinas bem estabelecidas e permaneceu praticamente a mesma com poucas modificações ao longo do tempo. Esta técnica possibilita a determinação indireta de proteínas em várias amostras (GALVANI & GAERTNER, 2006).

A amostra é aquecida com ácido sulfúrico para a digestão até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. O nitrogênio da proteína é reduzido e transformado em sulfato de amônia. Logo em seguida será adicionado NaOH concentrado e aquecido para liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico, formando borato de amônia. Esta solução será dosada com uma solução de HCI padronizada por titulação.

5.1.1 Digestão

Além dos agrupamentos proteicos, existe o nitrogênio sob a forma de amina, amida e nitrila, que é transformado em amônia (NH₃) a qual reage com o H₂SO₄, formando o sulfato de amônio (GALVANI & GAERTNER, 2006). Durante a digestão ocorrem as seguintes reações:

Matéria Orgânica + $H_2SO_4 \rightarrow SO_2 + CO_2 + H_2O + R - NH_2$ $R - NH_2 + H_2O + H_2SO_4 \rightarrow R - OH + NH_3$ $R - CONH_2 + H_2O + [H^+] \rightarrow R - COOH + NH_3$ $2 NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$

5.1.2 Destilação

Após a digestão inicia-se o processo de destilação que pode ser feita por aquecimento direto ou por arraste de vapor. O sulfato de amônio é tratado com hidróxido de sódio (NaOH), em excesso, ocorrendo a liberação de amônia (GALVANI & GAERTNER, 2006), conforme as reações:

$$(NH_4)_2SO_4 + NaOH \rightarrow 2 NH_4OH + Na_2SO_4$$

$$NH_4OH + calor \rightarrow NH_3 + H_2O$$

5.1.3 Titulação

Na última etapa o borato de amônio é titulado com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCI) de concentração conhecida até a viragem do indicador, conforme a reação:

$$NH_4H_2BO_3 + HCI \rightarrow H_3BO_3 + NH_4CI$$

5.2 MÉTODO DE BIURETO

Segundo ALMEIDA, MELO & SILVA (2015) a reação geral que caracteriza ligações peptídicas é chamada reação de biureto, nome dado à estrutura originada a partir da decomposição da ureia, quando esta é submetida a uma temperatura de aproximadamente 180°C que fornece resultado positivo nesse teste. Este método tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios como soro, urina, alimentos. Apesar de ser rápido, utilizar reagentes de baixo custo e não apresentar grande variação da absortividade específica para diferentes proteínas, esse método apresenta a desvantagem de baixa sensibilidade, pois os métodos que envolvem a reação de biureto requerem alta concentração de proteína na amostra, tornando-o desvantajoso quando comparado a outros métodos existentes.

Figura 14: Formação do Biureto. (In: www.fcfar.unesp.br)

O procedimento baseia-se na separação de tubos de ensaio contento as amostras que serão analisadas seguida pela adição gota a gota do reagente biureto e por fim observar e anotar os resultados. O aparecimento de coloração violeta indica que os íons Cu²⁺ provenientes do CuSO₄ formaram complexo com ligações peptídicas presentes na amostra, indica que se trata de uma proteína ou peptídeo (SOUZA & NEVES, 2013).

Figura 15: Interação entre o íon cúprico e as cadeias proteicas: (In: ALMEIDA et al, 2013)

5.3 MÉTODO DE LOWRY

O método de Lowry para determinação de proteínas consiste, basicamente, em duas reações, a primeira delas é a de redução do íon cobre, em condições alcalinas, formando um complexo com as ligações peptídicas, o íon de cobre monovalente conjuntamente às cadeias laterais de alguns aminoácidos da proteína (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) levam à redução dos componentes ácidos presentes no reagente de Folin amplificando a coloração primeiramente obtida, sendo assim, as amostras com tons de azul mais fortes devem conter maior concentração de proteínas. A concentração de proteína, nesse método, é calculada a partir da leitura da absorbância ou quantidade de luz absorvida, que é medida por um espectrofotômetro (AGOSTINI, 2015)

5.4 MÉTODO DE DUMAS

O método de Dumas consiste na oxidação total da amostra na presença de oxigênio 99,9995% a 800°C, seguida de redução dos óxidos de nitrogênio e detecção do nitrogênio

molecular produzido por um detector de condutividade térmica. A amostra sofre oxidação total na presença de oxigênio em elevadas temperaturas, seguida de redução dos óxidos de nitrogênio molecular produzido. E o teor de proteína é calculado multiplicando-se o teor de nitrogênio encontrado pelo fator 6,25 (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, 1984).

5.5 MÉTODO DE ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-NIR)

O método consiste em agrupar bandas de absorção a partir dos quais os compostos orgânicos podem ser identificados, já que a frequência de vibração entre as moléculas de um composto orgânico tem uma determinada absorção de luz. Essa energia absorvida vai para o detector que a converte em um sinal elétrico. Tudo isso baseado em uma curva espectral que prediz a composição da amostra.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

Todas as análises foram feitas nos laboratórios da empresa Tereos Amido e Adoçantes Brasil, localizada na rodovia Raposo Tavares, 421, Palmital – SP.

6.1 MATERIAIS

6.1.1 Amostras

Foram analisadas dez amostras comerciais de ração para cães adultos do tipo *Premium*. Elas foram previamente trituradas como os métodos exigiam.



Figura 16: Amostras de ração para cachorro antes de serem trituradas.

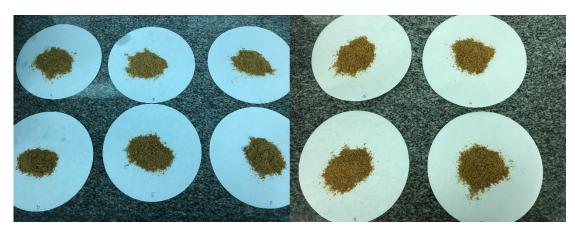


Figura 17: Amostras de ração para cachorro trituradas.

6.1.2 Equipamentos

- Analisador de Proteína marca LECO, modelo FP-528;
- Analisador Antaris II FT-NIR da marca ThermoNicolet;
- Balança analítica;
- Compressor de ar;
- Instalação de gases em tubos de cobre e reguladores de pressão conforme especificações técnicas do equipamento;
- Microcomputador com os softwares Microsoft Windows XP Professional versão 2002 e FP-528 versão 1.31.

6.1.3 Materiais e reagentes

- Cadinho em material refratário;
- Folhas de estanho;
- Lã de aço;
- Anidrona A.C.S. (perclorato de magnésio);
- Hélio (He) 99,999 %;
- LECOSORB (hidróxido de sódio 20-30 Mesh);
- Limalhas de cobre:
- N-Catalist (alumina);
- Óxido de alumínio em pellets;
- Reagente do forno (óxido de cálcio/Kaolin, 1:1 em massa)
- Tubo de Kjeldahl;
- Bloco digestor;
- Destilador;
- Erlernmeyer 250mL;

- Bureta;
- Ácido sulfúrico P.A, d = 1,84 10mL
- Mistura catalítica 2g (Na2SO4 e CuSO4.5H2O)
- NaOH 40% 25mL
- Solução de ácido bórico 3% 35mL
- Solução de HCI 0,1N
- Solução indicadora: vermelho de metila 0,2% + azul de metileno 0,2%

6.2 MÉTODOS

6.2.1 Análise de proteína pelo método Dumas

Foi pesado cerca de 250 mg de cada amostra de ração animal sobre folha de estanho. Embrulhou-se cada amostra, fazendo uma ponta com o excesso da folha, fechando bem a embalagem.

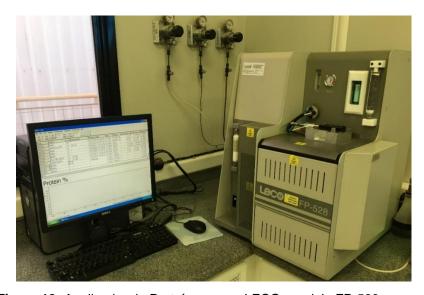


Figura 18: Analisador de Proteína marca LECO, modelo FP-528.

6.2.2 Análise de proteína por espectroscopia no infravermelho próximo por transformada de Fourier (FT-NIR)

As amostras foram inseridas no coletor do equipamento do qual iniciou a leitura.

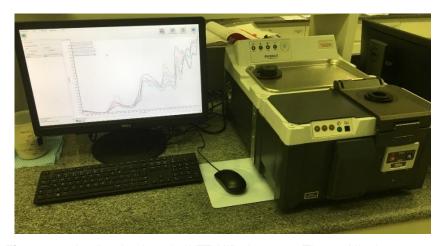


Figura 19: Analisador Antaris II FT-NIR da marca ThermoNicolet.

6.2.3 Análise de proteína pelo método Kjeldahl

300mg das amostras foram aquecida com ácido sulfúrico para a digestão até que o carbono e o hidrogênio sejam oxidados. Logo em seguida foi adicionado NaOH concentrado e aquecido para liberação da amônia dentro de um volume conhecido de uma solução de ácido bórico. Esta solução será dosada com uma solução de HCl 0,1M padronizada por titulação.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores observados foram comparados com os valores declarados no rótulo pelo fabricante. Adotando-se uma tolerância de 20% na análise, de acordo com a Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Os resultados das análises de laboratório foram, ainda, comparados com os valores mínimos e máximos permitidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Na tabela 7 são apresentados os resultados obtidos no método Dumas e na tabela 8 através do método FT-NIR. Os resultados de umidade foram ambos feitos no segundo método, pois o primeiro é incapaz de determinar.

Amostras de	Níveis de garantia através do método Dumas (%)								
rações Premium para cães adultos	Umidade (máx.)			Proteína (mín.)					
	Valor	Valor	Variação	Valor	Valor	Variação			
	Declarado	Observado	(%)	Declarado	Observado	(%)			
PRODUTO "A"	10	9,89	1,10	21	20,85	0,71			
PRODUTO "B"	12	11,79	1,75	21	21,01	0,05			
PRODUTO "C"	10	10,01	0,10	29	28,15	2,93			
PRODUTO "D"	12	11,98	0,17	20	19,35	3,25			
PRODUTO "E"	10	10,15	1,50	22	21,65	1,59			
PRODUTO "F"	10	10,20	2,00	28	27,23	2,75			
PRODUTO "G"	10	9,85	1,50	27	26,45	2,04			
PRODUTO "H"	12	11,93	0,58	20	19,66	1,70			
PRODUTO "I"	10	10,32	3,20	21	21,10	0,48			
PRODUTO "J"	10	9,85	1,50	22	21,65	1,59			

Tabela 7: Resultados obtidos no método Dumas.

Níveis de garantia através do método FT-NIR (%) Amostras de rações Umidade (máx.) Proteína (mín.) Premium para Valor Valor Valor Valor Variação Variação cães adultos Declarado Observado Declarado Observado (%) (%) (%) (%)(%) (%) PRODUTO "A" 10 1,10 21 2,67 9,89 20,44 PRODUTO "B" 12 11,79 1,75 21 20,98 0,10 PRODUTO "C" 10 10,01 0,10 29 28,45 1,90 PRODUTO "D" 12 11,98 0,17 20 19,67 1,65 PRODUTO "E" 10 10,15 1,50 22 22,01 0,05 PRODUTO "F" 10 10,20 2,00 28 27,83 0,61

Tabela 8: Resultados obtidos no método FT-NIR.

1,50

0,58

3,20

1,50

27

20

21

22

26,44

19,87

20,97

21,39

2,07

0,65

0,14

2,77

9,85

11,93

10,32

9,85

PRODUTO "G"

PRODUTO "H"

PRODUTO "I"

PRODUTO "J"

10

12

10

10

	Níveis de garantia através do método Kjeldahl (%)								
Amostras de rações	116	midada (máy	\	Protoína (mín.)					
Premium para	UI UI	midade (máx.)	Proteína (mín.)					
cães adultos	Valor	Valor	Variação	Valor	Valor	Variação			
	Declarado	Observado	(%)	Declarado	Observado	(%)			
	(%)	(%)		(%)	(%)				
PRODUTO "A"	10	9,89	1,10	21	21,65	3,10			
PRODUTO "B"	12	11,79	1,75	21	21,03	0,14			
PRODUTO "C"	10	10,01	0,10	29	29,01	0,03			
PRODUTO "D"	12	11,98	0,17	20	19,96	0,20			
PRODUTO "E"	10	10,15	1,50	22	22,51	2,32			
PRODUTO "F"	10	10,20	2,00	28	27,43	2,04			
PRODUTO "G"	10	9,85	1,50	27	27,59	2,19			
PRODUTO "H"	12	11,93	0,58	20	20,13	0,65			
PRODUTO "I"	10	10,32	3,20	21	21,42	2,00			
PRODUTO "J"	10	9,85	1,50	22	22,13	0,59			

Carpim & Oliveira (2008), analisaram 18 amostras de rações comerciais, sendo oito do tipo econômico e dez do tipo premium, comercializadas em Rio Verde-GO, os teores de umidade e proteína bruta, 12,50% e 87,50%, respectivamente, das amostras estavam em conformidade com os rótulos. Concluíram que as rações secas para cães adultos, vendidas em Rio Verde, são de boa qualidade já que atendem os limites exigidos pela legislação, há deficiências na rotulagem em relação aos níveis de garantia e há excesso no fornecimento diário de energia com o uso de rações econômicas.

Silva; Barros & Souza (2010) avaliaram nove marcas de rações secas para cães adultos comercializadas em Lajeado-RS, e obtiveram como resultado que 100% das rações analisadas estavam de acordo com o declarado no rótulo.

Carciofi & Jeremias (2006), avaliaram 49 marcas de rações para cães adultos e filhotes comercializados em Jaboticabal-SP. Observaram que 33,3% dos produtos econômicos para cães apresentaram menos proteína bruta do que declararam no rótulo.

Scheibel et. al (2011), analisaram três rações comerciais para cães e três para gatos em Lajeado-RS, observaram que apenas uma das amostras não estava dentro da legislação vigente e que 35% das amostras analisadas, estão em desacordo com o estabelecido pelas suas respectivas rotulagens.

Para Silva Junior (2011), que analisou três lotes de seis amostras de rações comerciais para cães adultos, obteve o resultado de que 50% das rações analisadas na cidade de Assis-SP continham menos proteína do que declarado no rótulo e 100% atendiam aos valores de umidade.

No presente trabalho os resultados atenderam os valores declarados na embalagem de acordo com a tolerância de 20% da legislação vigente e está acima dos padrões estabelecidos pela IN nº 9 do MAPA, com uma variação entre 1 e 3% entre os valores declarados e os observados. E os métodos utilizados foram coerente entre si, com resultados muito aproximados.

Esses resultados já eram esperados tendo em vista que, de acordo com dados da Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2013), o Brasil é o segundo maior do mundo em animais de estimação. Portanto, os cuidados e exigências com eles são muito maiores, fazendo com que a indústria busque entregar seus produtos com a maior qualidade possível para atender esse exigente mercado.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos pelos dois métodos de análise se apresentaram satisfatório, mostrando que 100% das rações analisadas estão de acordo com a legislação vigente e com o estabelecido pelos seus respectivos rótulos.

Um fator de extrema importância na escolha de rações para animais são parâmetros previstos pela legislação declarados nos rótulos das embalagens. A discordância dos valores declarados para os valores reais lesam os consumidores e fazem com que eles não atinjam suas expectativas com o produto adquirido.

9. REFERÊNCIAS

ABINPET, Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. **Dados de mercado**. Disponível em: http://abinpet.org.br/site/mercado/>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

AGOSTINI, Caroline. **Método de Lowry: Determinação de proteína em amostra de leite.** 2015. 14p. Trabalho de Conclusão de Curso – Departamento de Ciências Básicas – USP (Universidade de São Paulo), São Paulo, 2015.

ALMEIDA, Eduardo S.; MELO, Claudia Mayara T.; SILVA; Jorge Luis da S. S. **Análise do teor de proteínas em whey protein pelos métodos de Kjeldalh e Biureto.** 2015. Seminário de Iniciação Científica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, Minas Gerais (MG), Uberaba, 2015.

ALMEIDA, Vanessa Vivian de; CANESIN, Edmilson Antônio; SUZUKI, Rúbia Michele; PALIOTO, Graciana Freitas. Análise Qualitativa de Proteínas em Alimentos Por Meio de Reação de Complexação do Íon Cúprico. **Química Nova na Escol,** vol 35, N° 1, fevereiro de 2013, p. 34-40.

ANDRIGUETTO, J.L., PERLY, L. Nutrição Animal: As bases e os fundamentos da nutrição animal. v.01. São Paulo: Nobel, 2002.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIAL. **Official Publication 2003**, Association of American Feed Control Official, 2003.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 14th ed. Arlington: AOAC International, 1984.

BELLAVER C, Easter RA Evolution of swine diet formulation based on amino acid digestibility estimates. Pesquisa Agropecuária Brasileira 1998; 33:745-754.

BLANCO, A., BRESSANI, R. **Biodisponibilidad de aminoácidos in el frijol (Plhaseolus vulgaris)**. Archivos Latinoamericano de Nutrición, v. 41, n. 1, p. 38-51, 1991.

BORGES, F.M.O. **Nutrição e manejo Alimentar de cães na Saúde e na Doença**. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG. 1998. 103p. (Cadernos Técnicos n.23).

BORGES, F.M.O; SALGARELLO, M.R.; GURIAN, M.T. Recentes avanços na nutrição de cães e gatos. 2003.

BRASIL. Decreto 6296/2007. Aprova o Regulamento da Lei nº 6.198, de 26 de dezembro de 1974, que dispõe sobre a inspeção e a fiscalização obrigatórias dos produtos destinados à alimentação animal, dá nova redação aos arts. 25 e 56 do Anexo ao Decreto nº 5.053, de 22 de abril de 2004, e dá outras providências. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 11 de dezembro de 2007.

BRASIL. Instrução Normativa n. 9 de 9 de julho de 2003. **Aprova o Regulamento Técnico sobre fixação de Padrões de Identidade Qualidade de Alimentos Completos e de Alimentos Especiais destinados a cães e gatos**. Diário Oficial da União de 14 de julho de 2003.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. 4ª. Ed. São Paulo: Pearson Prentice e Hall, 2006. Vol. 2. Capítulo 23.

BUTOLO, J.E. Qualidade de Ingredientes na alimentação animal. São Paulo. 2002.

CAMPOS, Ricardo de Souza. **Extração aquosa de pectina a partir do bagaço da laranja**. 2012. 43 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química) — Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA / Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis - IMESA, São Paulo, Assis, 2012.

CARCIOFI, Aulus Cavalieri; JEREMIAS, Juliana Toloi. **Progresso científico sobre nutrição de animais de companhia na primeira década do século XXI.** 2010. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, 2010. P. 35-41.

CARPIM, William Germano; OLIVEIRA, Maria Cristina. **Qualidade nutricional de rações secas para cães adultos comercializadas em Rio Verde – GO**. Revista biotemas, v. 22, n. 2, junho, 2009, 181-186.

CASSINI, ALINE SCHILLING, **Análise das características de secagem da proteína texturizada de soja**; Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Escola de Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 2004.

CECCHI, Heloisa Mascia. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 2003.

CHRISPINO, Álvaro. O que é Química, 2 ed., São Paulo, Editora Brasiliense, 1991.

GALVANI, Fabio; GAERTNER, Eliney. Adequação da Metodologia Kjeldahl para determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta. Corumbá. Disponível em: http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/812198/1/CT63.pdf>. Acesso em: 15 jul. 2016.

GENTON, L.; MELZER, K.; PICHARD, C. Energy and macronutrient requirements for physical fitness in exercising subjects. *Clinical Nutrition*, 2010.

GOMES, J. C., OLIVEIRA, G. F. **Análises Físico-Químicas de Alimentos**. Editora UFV, 2011.

GUIMARÃES, Cleidson Carneiro. Experimentação no Ensino de Química: Caminhos e Descaminhos Rumo à Aprendizagem Significativa. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 3, agosto, 2009, p. 198-202.

HERMANN, JANICE R. **Protein and the Body.** Oklahoma Cooperative Extension Service, Division of Agricultural Sciences and Natural Resources. Oklahoma State University, 1995.

KRABBE, E.L.; LOIOLA, A. **Perdas nutricionais durante a secagem do alimento extrusado**. In: V Simpósio sobre nutrição de animais de estimação, 2005, Campinas, Anais...Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, p. 115-120.

LEHNINGER, A.L., Lehninger Princípios da bioquímica / David L. Nelson, Michael M. cox; traduzido por Arnaldo Antônio Simões, Wilson Roberto Navega Lodi. – 3 ed. – São Paulo 2002.

MARZZOCO, A., TORRES, B.B., **Bioquímica Básica** 2ed., Rio de Janeiro: Guanabara-koogan, 1999.

MILLWARD, DJ. The nutritional regulation of muscle growth, feed efficiency, and body composition of age-0 striped bass. Transactions of the American Fisheries Society, 1989.

MODLER, H.W. Milk processing. In: NAKAI, S.; MODLER, W. (Eds.). **Food proteins: processing applications**. Wiley -VCH, Inc., 2000. p.1-21.

MONTANARINI MARIA, **Soja: Nutrição e Gastronomia**; São Paulo: Editora Senac, 2009.

NACIONAL RESEARCH COUNCIL – **NRC. Nutrient Requirements of Dogs National Academy Press.** Washington, 428p, 2006.

NELSON, D. L., COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5^a. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

PARSONS, C.M.; CASTANON, F.; MAN, Y. **Protein and amino acid quality of meat an bone meal**. Poultry Science. v 61, 1998.

PETBR, **A força dos nutrientes**. Disponível em http://www.petbrasil.com.br, acesso em 21/10/2008. POND, W.G.; CHURCH, D.C.

POND, W.G.; CHURCH, D.C.; POND, K.R. **Basic animal nutrition and feeding**. 4 ed., John Wiley, New York, p. 531, 1995.

PONTES, Altem Nascimento; SERRÃO, Caio Renan Goes; FREITAS, Cíntya Kércya Araújo de; SANTOS, Diellem Cristina Paiva dos; BATALHA, Sarah Suely Alves. O Ensino de Química no Nível Médio: Um Olhar a Respeito da Motivação. In: Encontro Nacional de Ensino de Química, 14, 2008, Curitiba, Brasil. **Anais do XIV Encontro Nacional de Ensino de Química (ENEQ)**, julho, 2008, p. 1-10.

ROBINSON, E. H. e LI, M. H. Low protein diets for channel catfish lcatalurus punctatus raised in earthen ponds at high density. Journ. Worl. Aquac. Soc., 1997.

SAAD, F.M.O.B.; DUARTE, A.; SAAD, C.E.P.; SILVA JR, J.W.; LIMA, L.M.S.; LARA, L.B. Curso de Pós-graduação "Lato Sensu" (Especialização) a Distância — **Nutrição e Alimentação de Cães e Gatos.** UFLA/FAEPE, Lavras, p.129, 2005.

SCHEIBEL, D. L.; LIVINALI, E.; PIVATTO, L.; OLIVEIRA, E. C. **Determinação de cálcio, fósforo e proteína em rações animais (cães e gatos).** Revista destaques acadêmicos, ano 3, n. 4, 2011 - CETEC/UNIVATES.

SEIXAS, J. R. C; ARAUJO, W. A.; FELTRIN, C. A.; MUCIO, C. R., **Fontes proteicas para alimentos pet.** III Simpósio sobre Nutrição de Animais de Estimação Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. Campinas. 2003.

SGARBIERI, V.C. Proteínas em alimentos proteicos; Propriedades, degradações, modificações. 1 ed. São Paulo: Livraria Varela. 1996, 517p.

SILVA, D.J., QUEIROZ, A.C., Análise de Alimentos. 2.ed. Viçosa: UFV, 2002.

SILVA, Cleimar Vedoy; BARROS, Francisco de; SOUZA, Claucia Fernanda Volken de. **Qualidade nutricional de rações secas para Cães adultos comercializadas em LajeadoRS**. Revista brasileira de tecnologia agroindustrial. v. 04, n. 02, p.153-160, 2010.

SILVA JUNIOR, Waldir da. Avaliação de parâmetros comparativos da qualidade bromatológica em embalagens de rações secas para cães adultos, consumidas na cidade de Assis.. 2011. 42 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química) — Fundação Educacional do Município de Assis - FEMA / Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis - IMESA, São Paulo, Assis, 2011.

SOUZA, Karina Ap. De Freitas Dias; NEVES, Valdir Augusto. **Experimentos de Bioquímica**. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Disponível em: <a href="http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/introducao_proteinas/introducao_proteinassintroducao_proteinas

SOUZA, Raphael de. Extração e Quantificação de Inulina a partir da raiz de Chicória. 2011. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Química) — Fundação Educacional do Município de Assis — FEMA / Instituto Municipal de Ensino Superior de Assis — IMESA, São Paulo, Assis, 2011.

STEFFENS, W. **Principles of fish nutrition**. – Ellis Harwood, Chichester, England, UK – 1989.

STEIFF, E. L.; BAUER, J. E. Nutritional adequacy of diets formulated for companion animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.219, n.4, p.492-497, 2002.

UNESP, Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho", **Experimentos de Bioquímica**. Disponível em:

http://www.fcfar.unesp.br/alimentos/bioquimica/praticas_proteinas/reacoes_coradasdois3.htm>. Acesso em 12 set. 2017.

VERNON, YOUNG; PETER PELLETT (1994). Plant proteins in relation to human protein and amino acid nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition.*

VERSTEGEN, M.W.A., JONGBLOED, A.W. **Cristalline amino acids and nitrogen emission**. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK – 2003.