



Universidade Federal
de Campina Grande

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
MESTRADO EM ZOOTECNIA

CERA DE CARNAÚBA NA MICROENCAPSULAÇÃO DE UREIA PARA
LIBERAÇÃO LENTA

Tiago Tavares Brito de Medeiros

Patos – PB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
MESTRADO EM ZOOTECNIA

CERA DE CARNAÚBA NA MICROENCAPSULAÇÃO DE UREIA PARA
LIBERAÇÃO LENTA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, como uma das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de concentração Mestrado em Zootecnia, para obtenção do título de mestre.

Tiago Tavares Brito de Medeiros

Orientador: Prof. Dr Aderbal Marcos de Azevedo Silva

Co-orientador: Prof. Dr. André Leandro da Silva

Patos 2017

M488c Medeiros, Tiago Tavares Brito.

Cera de carnaúba na microencapsulação de ureia para liberação lenta. / Tiago Tavares Brito Medeiros. - Patos - PB: [s.n], 2017.

50 f.

Orientador: Professor Dr. Aderbal Marcos de Azevedo Silva; Co-Orientador: André Leandro da Silva.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

1. Microencapsulação de ureia. 2. Plantas da Caatinga - uso farmacológico. 3. Cera de Carnaúba. 5. Carnaúba - uso da cera. 6. Ureia - microcapsulação. 7. Liberação lenta da ureia. I. Silva, Aderbal Marcos de Azevedo. II. Silva, André Leandro da. Título.

CDU:615.014.6(043)

Elaboração da Ficha Catalográfica:

Johnny Rodrigues Barbosa
Bibliotecário-Documentalista
CRB-15/626



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIENCIA ANIMAL**

PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO

TÍTULO: “Cera de carnaúba na microencapsulação de ureia para liberação lenta”

AUTOR: TIAGO TAVARES BRITO DE MEDEIROS

ORIENTADOR: Prof. Dr. ADERBAL MARCOS DE AZEVEDO SILVA

JULGAMENTO

CONCEITO: APROVADO

Prof. Aderbal Marcos de Azevêdo Silva
Presidente

Prof. André Leandro da Silva
1º Examinador

Prof. Leilson Rocha Bezerra
2º Examinador

Patos - PB, 31 de março de 2017

Prof. José Fábio Paulino de Moura
Coordenador

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas inúmeras graças que me concedeu e por ser meu alicerce para enfrentar os obstáculos da vida.

Aos meus pais, Geraldo e Dalva, por serem minha inspiração, por sempre me apoiarem a seguir o caminho dos estudos, me tranquilizarem sempre que foi necessário e terem me dado a condição de ser quem sou.

Às minhas irmãs, Geórgia e Clarice, por sempre me darem apoio acreditando que sou capaz, pelas inúmeras ajudas dadas quando necessitei e por terem aguentado meus momentos de estresse.

Aos meus avós (*in memoriam*) que mesmo não estando mais nesse plano, contribuíram para minha educação e rogando e me protegendo através do amor, junto ao Pai Celestial.

À toda a minha família, a quem agradeço imensamente por todos os momentos vividos e de preocupação com o andar do meu mestrado e em especial à Tia Ana, que tanto me ajudou no desenvolver da minha pesquisa e na minha vida profissional.

À minha namorada Laís, por sempre me apoiar e me dar forças quando precisei e por tantos momentos vividos que me tranquilizava a alma.

Ao meu orientador Prof. Dr. Aderbal, que tanto me proporcionou aprendizados que levarei para toda a vida e por se fazer presente não só na minha vida acadêmica como em minha vida pessoal de forma tão fraterna.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. André por tantos ensinamentos, pelo convívio sempre amistoso e por tamanha humildade e por tanta confiança depositada em mim. E por tornar-se mais um grande amigo que meu mestrado proporcionou a mim.

Ao Prof. Dr. Leilson, pela contribuição dada na elaboração da dissertação.

À Prof^a. Dr^a Selma Elaine Mazzetto e Prof. Dr. Diego Lomonaco, Universidade Federal do Ceará, Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos, pelas análises de Espectroscopia na região do Infravermelho, Calorimetria exploratória diferencial, Termogravimetria.

Ao Prof. Dr. Deuber Agostini, Universidade Estadual Paulista, Laboratório de Eletrofição e Tecnologia, pela Microscopia eletrônica de varredura.

À Prof^a. Dr^a Mônica Tejo, UFCG-Pombal, Laboratório de Tecnologia de Grãos e Cereais, pela determinação de atividade de água.

À equipe de funcionários do LANA, Otávio e Andreza, por todo apoio prestado e momentos de descontração.

Aos meus amigos da graduação e mestrado que contribuíram para realização desse projeto Gabriella, Ramon, Jéssica, Ariadne e Joelson, em nome de quem saúdo os demais amigos e colegas.

Aos meus irmãos da Veterinária que estão sempre presentes, Renan, Maycon, Artur e Thyago.

A Ari, pela competência, responsabilidade e presteza para com todos os alunos do programa de pós graduação.

A todos os professores do PPGZOO/CSTR por todo ensinamento proporcionado nesses dois anos de mestrado.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUÇÃO GERAL.....	9
CAPÍTULO 1 - Ureia microencapsulada em matriz de cera de carnaúba para liberação lenta.....	11
Resumo	12
Abstract.....	12
1. Introdução	13
2. Material e Métodos	14
2.1. Obtenção dos sistemas microencapsulados	14
2.2. Avaliação do processo de microencapsulação.....	15
2.2.1. Rendimento de microencapsulação	15
2.2.2. Eficiência de microencapsulação.....	15
2.3. Avaliação e caracterização dos sistemas microencapsulados	16
2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	16
2.3.2. Termogravimetria (TG)	16
2.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	16
2.3.4. Avaliação da umidade e atividade de água	17
2.3.5. Avaliação do teor de nitrogênio encapsulado (Determinação de carga).....	17
2.3.6. Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR).....	18
3. Resultados e Discussão.....	18
4. Conclusão.....	27
5. Referências.....	28
CAPÍTULO 2 - Cinética de degradação, perfil e mecanismo de liberação de ureia microencapsulada em cera de carnaúba.....	31
Resumo	32
Abstract.....	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos	34
2.1. Local do experimento	34

2.2. Obtenção da ureia microencapsulada	35
2.3. Animais, manejo e delineamento experimental	36
2.4. Cinética da degradação <i>in situ</i>	36
2.5. Perfil e mecanismo de liberação da Ureia microencapsulada.....	38
2.6. Análises estatísticas	39
3. Resultados.....	39
3.1. Degradabilidade <i>in situ</i>	40
3.2 Perfil de liberação do nitrogênio.....	42
3.3 Mecanismo de liberação do núcleo.....	44
4 Discussão	44
4.1 Degradabilidade <i>in situ</i>	44
4.2. Perfil de liberação de Nitrogênio	45
4.3. Mecanismo de liberação do núcleo.....	47
5. Conclusões	47
6. Referências.....	47

RESUMO

Objetivou-se utilizar a cera de carnaúba para encapsular a ureia, a fim de elaborar um sistema de liberação lenta. Foram obtidos três sistemas microencapsulados pela técnica de Liofilização, com diferentes proporções entre encapsulante e núcleo (2:1, 3:1 e 4:1). Os produtos foram avaliados quanto ao processo de microencapsulação através da análise de rendimento e eficiência, além de caracterizados por técnicas de Termogravimetria, Calorimetria exploratória diferencial, determinação de umidade e atividade de água, determinação de carga, Espectroscopia na região de infravermelho e Microscopia eletrônica de varredura. Avaliou-se também a cinética de degradação *in situ*, perfil de liberação de nitrogênio e mecanismo de liberação do núcleo em pequenos ruminantes. As formulações não diferiram muito entre si e todas apresentaram excelentes propriedades, incluindo a inibição da higroscopicidade da ureia, com destaque para a formulação 2:1, que exibiu os maiores valores de rendimento e maior eficiência de microencapsulação, enquanto a formulação 4:1 apresentou maior estabilidade térmica e menor teor de umidade. A obtenção de microesferas de ureia utilizando a cera de carnaúba demonstrou resultados exitosos para todos os sistemas microencapsulados desenvolvidos, evidenciando o potencial promissor de uso desta matéria-prima regional para tal finalidade. A cinética demonstrou que o aumento da proporção de cera reduziu não só a degradação, mas também o aproveitamento da ureia, como pode ser comprovado também no perfil de liberação, onde a UME2 apresentou uma liberação mais controlada que as demais UME's estudadas. A cera de carnaúba propiciou uma maior biodisponibilidade da ureia, reduzindo o risco de intoxicação. Os principais mecanismos de liberação foram a difusão e a biodegradação, fato que impediu o aproveitamento completo do N, mas não diminuiu a taxa de liberação. O comportamento das granulometrias estudadas demonstrou que o aumento do tamanho da partícula tende a regular melhor a taxa de liberação do N, sendo mais eficaz que acrescentar cera ao sistema. Desta forma conclui-se que a cera de carnaúba é uma alternativa promissora para liberação gradual de ureia, sendo apontada a concentração 2:1 como a mais favorável.

Palavras chave: lenta, liberação, liofilização, microesferas

ABSTRACT

The objective was to use the carnauba wax to encapsulate the urea in order to elaborate a slow release system. Three microencapsulated systems were obtained by the Lyophilization technique, with different ratios between encapsulant and core (1:2, 1:3 and 1:4). The products were evaluated for the microencapsulation process through the performance and efficiency analysis, besides characterized by techniques of Thermogravimetry, Exploratory differential calorimetry, Determination of moisture and water activity, determination of charge, Spectroscopy in the infrared region and Electron microscopy of scanning. *In situ* degradation kinetics, nitrogen release profile and nucleus release mechanism were evaluated in small ruminants. The formulations did not differ much from each other and all showed excellent properties, including inhibition of urea hygroscopicity, especially the formulation 1:2, which exhibited the highest yield values and highest microencapsulation efficiency, while the formulation 1:4 presented Higher thermal stability and lower moisture content. The production of urea microspheres using carnauba wax demonstrated successful results for all developed microencapsulated systems, evidencing the promising potential of using this regional raw material for this purpose. The kinetics showed that the increase of the wax content reduced not only degradation but also the use of urea, as can also be verified in the release profile, where UME2 showed a more controlled release than the other UMEs studied. Carnauba wax provided a higher bioavailability of urea, reducing the risk of intoxication. The main mechanisms of release were diffusion and biodegradation, a fact that prevented the complete use of N, but did not decrease the rate of release. The behavior of the granulometries studied showed that the increase of the particle size tends to regulate the rate of N release better, being more effective than adding wax to the system. Thus, it is concluded that carnauba wax is a promising alternative for the gradual release of urea, with the concentration 1:2 being the most favorable.

Key words: lyophilization, microspheres, release, slow

LISTA DE FIGURAS e TABELAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Micrografias eletrônicas de varredura: a) Cera de Carnaúba, b) Ureia e c) Ureia de liberação controlada.	17
Figura 2. Análise de rendimento de encapsulamento das formulações (2:1; 3:1 e 4:1).	18
Figura 3. Espectrogramas FTIR da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1 e 4:1).	20
Figura 4. Curvas termogravimétricas (TG) da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1; 4:1).	22
Figura 5. Curvas de DSC da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1; 4:1).	23
Tabela 1. Quantificação do nitrogênio total, proteína bruta, teor teórico de ureia, teor real médio de ureia e eficiência da encapsulação.	19
Tabela 2. Valores obtidos para umidade após o preparo e após 5 meses de estocagem e atividade de água da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1 e 4:1)	19
Tabela 3. Bandas de absorção de FTIR da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1 e 4:1).	21

CAPÍTULO 2

Figura 1. Perfis de liberação do Nitrogênio das UME's 2:1; 3:1 e 4:1, para os dois tamanhos de partículas estudados.	37
Figura 2. Micrografias da UME, obtidas antes (a) e após (b) o processo de digestão.	38
Tabela 1. Estimativas da fração solúvel inicial (a), fração insolúvel potencialmente degradável (b), fração indigerível (c), taxa de degradação (Kd), degradação efetiva (DE) e degradação potencial (DP) da matéria seca e do nitrogênio das UME's.	35
Tabela 2. Teste de Tukey aplicado para as variáveis da cinética da matéria seca e do nitrogênio do microencapsulado.	35

INTRODUÇÃO GERAL

A ureia é uma fonte de nitrogênio não proteico (NNP) bastante empregada na dieta de ruminantes, possuindo baixo custo por unidade de nutriente, configurando-se como uma importante alternativa para substituir parcialmente a proteína verdadeira encontrada nos farelos e tortas vegetais.

Devido à sua alta solubilidade, a ureia é rapidamente hidrolisada no rúmen em amônia e, quando em excesso, ultrapassa a capacidade fisiológica do fígado em ureia novamente para voltar o rúmen, via saliva, proporcionando o acúmulo de amônia na corrente sanguínea e acarretando um quadro de intoxicação conhecido por alcalose ruminal.

Para evitar ou diminuir os quadros tóxicos provenientes da ureia, se faz necessário a adaptação ininterrupta da microbiota ruminal à essa fonte de nitrogênio não proteico (NNP) para que a população de bactérias ureolíticas sejam aumentadas gradativamente. Para auxiliar esta adaptação, tem-se estudado formas para controlar a liberação da ureia no ambiente ruminal, de forma que com a redução dessa velocidade de degradação, haja mais tempo para o organismo transformar o NNP gradativamente em proteína microbiana.

Através de determinados processamentos industriais, pode-se reduzir a velocidade de degradação da ureia no rúmen e diversas tecnologias têm sido testadas nas últimas décadas, incluindo a amireia (BARTLEY & DEYOE, 1975), ureia tratada com formaldeído (PROKOP & KLOPFENSTEIN, 1977), proteção com gordura (FORERO et al., 1980), proteção com biureto (LÖEST et al., 2001), ureia líquida e cloreto de cálcio (CASS & RICHARDSON, 1994) e também ureia encapsulada com polímero (GALO et al., 2003).

No entanto, para o desenvolvimento de tecnologias para retardar ou controlar a liberação, um dos obstáculos encontrados é a viabilidade econômica, visto que as alternativas encontradas encarecem ainda mais a ureia e outro problema é a questão ambiental pelo uso de compostos que poluem o meio ambiente.

A cera de carnaúba por ser um produto natural, nativo da caatinga, abundante e facilmente encontrado no mercado brasileiro, possui potencial como uma alternativa interessante para encapsular essa fonte de NNP, por ser um composto inerte à saúde ruminal e animal, por ter considerável hidrofobicidade e ser biodegradável.

Considerando os desafios da administração da ureia devido à alta atividade ureolítica do rúmen e ao mesmo tempo a importância da sua utilização, principalmente no semiárido nordestino, em que no período das constantes secas as forrageiras apresentam baixos níveis de proteína, e levando em conta ainda a relevância de explorar sustentavelmente o potencial tecnológico da biodiversidade, em especial a regional, hipotetizou-se a elaboração de uma fonte de NNP de liberação lenta, através da microencapsulação de ureia em matriz lipídica de cera de carnaúba, utilizando a liofilização como método de secagem.

Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho elaborar três formulações de ureia de liberação lenta com diferentes proporções de cera e ureia, avalia-las e caracterizá-las quanto ao rendimento, eficiência de microencapsulação, técnicas de Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Termogravimetria (TG), Calorimetria exploratória diferencial (DSC) Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), determinação de umidade, atividade de água, avaliação do nitrogênio encapsulado, além de investigações a cerca da cinética de degradação *in situ*, perfil de liberação de nitrogênio e mecanismo de liberação do núcleo em pequenos ruminantes.

CAPÍTULO 1 - Ureia microencapsulada em matriz de cera de carnaúba para liberação lenta

Ureia microencapsulada em matriz de cera de carnaúba para liberação lenta

Resumo

Objetivou-se encapsular a ureia usando como material de parede a cera de carnaúba, para elaboração de um sistema de liberação lenta. Foram obtidos três sistemas microencapsulados pela técnica de Liofilização, com diferentes proporções entre núcleo e encapsulante (1:2; 1:3; 1:4). Os produtos foram avaliados quanto ao processo através da análise de rendimento e eficiência além de caracterizados por técnicas de Termogravimetria (TG), Calorimetria exploratória diferencial (DSC), umidade e atividade de água, determinação de carga, Espectroscopia na região de infravermelho e Microscopia eletrônica de varredura. As formulações não diferiram muito entre si e todas apresentaram excelentes propriedades, incluindo a inibição da higroscopicidade da ureia, com destaque para a formulação 2:1, que exibiu os maiores valores de rendimento e maior eficiência de microencapsulação, enquanto a formulação 4:1 apresentou maior estabilidade térmica e menor teor de umidade. A obtenção de microesferas de ureia utilizando a cera de carnaúba demonstrou resultados exitosos para todos os sistemas microencapsulados desenvolvidos, evidenciando o potencial promissor de uso desta matéria-prima regional para tal finalidade.

Palavras chave: lenta, liberação, liofilização, microesferas

Abstract

The objective of this study was to encapsulate urea using carnauba wax as the wall material for the elaboration of a slow release system. Three microencapsulated systems were obtained by the Lyophilization technique, with different ratios between core and encapsulant (1:2, 1:3 and 1:4). The products were evaluated in terms of the efficiency and yield analysis, characterized by techniques of Thermogravimetry (TG), Differential scanning calorimetry (DSC), moisture and water activity, charge determination, Infrared spectroscopy and Electron microscopy of scanning. The formulations did not differ much from each other and all showed excellent properties, including inhibition of urea hygroscopicity, especially the formulation 1:2, which exhibited the highest yield values and highest microencapsulation efficiency, while the formulation 1:4 presented Higher thermal stability and lower moisture content. The production of urea microspheres using

carnauba wax demonstrated successful results for all developed microencapsulated systems, evidencing the promising potential of using this regional raw material for this purpose.

Key words: lyophilization, microspheres, release, slow

1. Introdução

A nutrição animal é um ramo da ciência que tem crescido e investido em tecnologias para inovação nas formas de alimentar, forma de apresentação de alimentos, maneiras para aumentar o tempo de prateleira, liberação controlada e/ou lenta de nutrientes em locais específicos no trato gastrointestinal e tantas outras.

A ureia é uma fonte de nitrogênio não proteico (NNP) bastante empregada na dieta de ruminantes, possuindo baixo custo por unidade de nutriente, e alto equivalente proteico de 281% (CASTAÑEDA-SERRANO et al., 2013) configurando uma importante alternativa para substituição parcial da proteína oriunda de alimentos de origem vegetal encontrada nos farelos e tortas vegetais.

Ao ser ingerida pelo animal, a ureia é rapidamente hidrolisada, porém quando os níveis de amônia absorvidos pelo rúmen, ultrapassam o limite do fígado de biotransformá-la em ureia novamente, ocorre acúmulo da mesma na corrente sanguínea, causando intoxicação conhecida como Alcalose Ruminal e com possibilidade de levar o animal ao óbito (AZEVEDO et al., 2008).

Através de determinados processamentos industriais, pode-se reduzir a velocidade de degradação da ureia no rúmen e diversas tecnologias têm sido testadas nas últimas décadas, incluindo a amireia (BARTLEY & DEYOE, 1975), ureia tratada com formaldeído (PROKOP & KLOPFENSTEIN, 1977), proteção com gordura (FORERO et al., 1980), proteção com biureto (LÖEST et al., 2001), ureia líquida e cloreto de Ca (CASS & RICHARDSON, 1994) e também ureia encapsulada com polímero (GALO et al., 2003).

Visto isso, inúmeras tentativas de encapsulamento deste alimento têm surgindo na expectativa de reduzir os problemas de toxicidade, garantir uma liberação mais branda e assim um melhor aproveitamento por parte da microbiota ruminal como apontado por Huntington et al., 2006.

A cera de carnaúba consolida-se como uma alternativa interessante para encapsular essa fonte de NNP, por ser um composto inerte, insolúvel em água devido sua característica hidrofóbica (PEZZINNI et al., 2007) e portanto, alternativa viável para proteger a ureia que é solúvel. Apesar da toxicidade de alguns lipídeos aos microorganismos do rúmen, a cera de carnaúba é inerte para a saúde ruminal e animal por ser um lipídeo saturado de cadeias longas de ésteres ser um produto natural e nativo de uma palmeira brasileira *Copernicia cerifera* (RODRIGUES et al., 2014) contida no bioma caatinga (VARELA e CARVALHO, 2009).

Baseando-se nessas prerrogativas, este trabalho objetivou encapsular a ureia usando como material de parede a cera de carnaúba, por meio do processo de liofilização.

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção dos sistemas microencapsulados

Três formulações de ureia microencapsulada em matriz lipídica de cera de carnaúba foram desenvolvidas, em que as proporções (m/m) entre núcleo e encapsulante foram de 1:2; 1:3 e 1:4, respectivamente. As etapas de preparo a seguir foram definidas em testes prévios.

Para preparar as emulsões que resultaram nos produtos microencapsulados utilizados nos experimentos e caracterizações iniciais, as respectivas massas de ureia correspondentes a cada formulação foram pesadas em balança analítica Adventurer AR2140 (Marca Ohaus, Parsippany, Estados Unidos®) em béqueres separados, dissolvidos com água destilada até total dissolução. Em seguida, a cera de carnaúba foi pesada em béqueres diferentes e fundida em banho maria, sob temperatura de 85 °C. Logo após, teve início o preparo propriamente dito das emulsões, que foi feito a quente em banho maria sob temperatura de 85 °C, devido à rápida solidificação da cera, uma vez que seja retirada do aquecimento.

Ao béquer contendo a cera fundida foi adicionado Span 80 - Mono-oleato de sorbitano (volume correspondente a 5% com base na massa de cera de carnaúba), um estabilizante e emulsificador próprio para formulação de emulsões do tipo fase aquosa

dispersa em fase oleosa (A/O), alvo do estudo. A mistura foi feita com auxílio de um bastão de vidro. Antes de ser adicionada, a solução de ureia foi aquecida até a temperatura da cera fundida e, posteriormente, adicionada lentamente à cera, sob agitação constante de 120 rpm durante 20 min, com bastão de vidro. Por fim, as emulsões foram transferidas para recipientes plásticos, identificadas, congeladas em freezer horizontal a -25 °C por 24 h. Após esse período, as emulsões congeladas foram submetidas a secagem principal em liofilizador Alpha 1-4 LD Plus (Marca Christ, Osterode AM Harz, Alemanha®), sob pressão de 0,11 mbar e temperaturas de -60 °C por 24 h, seguida de secagem complementar em estufa a 55 °C por 6 h.

De posse da ureia microencapsulada, iniciou-se a caracterização do produto por meio das seguintes etapas.

2.2. Avaliação do processo de microencapsulação

2.2.1. Rendimento de microencapsulação

O rendimento da microencapsulação foi baseado nas massas de ureia, massa do tensoativo (Span 80) e cera de carnaúba utilizadas no preparo das emulsões e na massa final após secagem, calculado por meio da equação seguinte:

$$\mathbf{RE = (M_{final}/M_{inicial}) \times 100}$$

Onde: RE = Rendimento da encapsulação; M_{final} : Massa do produto microencapsulado após secagem; $M_{inicial}$ = Massa seca de ureia, cera de carnaúba e Span 80.

2.2.2. Eficiência de microencapsulação

A eficiência de microencapsulação avaliou a capacidade de retenção de ureia pela matriz de cera de carnaúba e foi determinada com base no teor de ureia inserido e no teor retido após o processo. A eficiência foi calculada por meio da equação seguinte:

$$\mathbf{EM = (U_{real}/U_{teórica}) \times 100}$$

Onde: EM = Eficiência da microencapsulação; Ureal: Teor real de ureia retido; Uteórica: Teor de ureia inserido.

2.3. Avaliação e caracterização dos sistemas microencapsulados

2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para obtenção das micrografias, os produtos encapsulados foram previamente cobertos por uma fina camada de ouro no metalizador SC-701 (Marca Sanyu electron, Tóquio, Japão®). Para tal, as amostras foram fixadas com fita de carbono, o tempo de metalização foi de 3 min, sob amperagem de 10 mA. As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura Vega 3 (Marca Tescan, Kohoutovice, República Tcheca®), com voltagem de aceleração de 20 kV.

2.3.2. Termogravimetria (TG)

As curvas TG foram obtidas em analisador térmico TGA/SDTA 851e (Marca Mettler Toledo, Columbus, Estados Unidos®), sob atmosfera inerte (Fluxo de 50 mL/min), taxa de aquecimento de 10 °C/min, em uma faixa de temperatura entre 30 e 600 °C, utilizando cadinho de alumina (óxido de alumínio) contendo cerca de 5 mg de amostra.

O parâmetro utilizado para determinação da temperatura inicial de degradação foi o T_{onset} segundo Haines (2002), obtido pela intersecção de uma tangente traçada entre as linhas de base horizontais superior, inferior e a parte íngreme da curva sigmoidal, caracterizada como o ponto que melhor representa a temperatura de degradação de um composto.

2.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC dos materiais foram obtidas em um equipamento é DSC 823e (Mettler Toledo, Columbus, Estados Unidos®), sob atmosfera inerte (Fluxo de 50 mL/min), taxa de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de temperatura entre 30 e 150 °C, utilizando cadinho hermético de alumínio contendo cerca de 5 mg de amostra.

2.3.4. Avaliação da umidade e atividade de água

A determinação de umidade foi feita pelo método gravimétrico, em estufa com circulação e renovação de ar TE-391/1 (Marca Tecnal, Piracicaba, Brasil®) a 105 °C até atingir massa constante, enquanto a atividade de água foi verificada em medidor de atividade de água 3TE (Marca Aqualab, Albufeira, Portugal®) a 25 °C.

2.3.5. Avaliação do teor de nitrogênio encapsulado (Determinação de carga)

As análises de nitrogênio, parâmetro que foi utilizado para determinação de carga, foram feitas de acordo com o método de *Kjeldahl*, descrito por AOAC (2012).

O método de *Kjeldahl* baseia-se na digestão ácida, onde o nitrogênio da amostra é transformado em amônio (NH_4^+), o qual é posteriormente separado por destilação e finalmente quantificado por titulação.

A etapa da digestão foi realizada em tubos de ensaios abertos, onde se acrescentou juntamente com a alíquota de solução retirada do béquer, 1 g de mistura catalisadora (K_2SO_4 - Sulfato de Potássio e $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - Sulfato de Cobre pentaidratado, na proporção 100:1, respectivamente) e 5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Executou-se a digestão no bloco digestor em capela de exaustão a temperatura final de 450 °C, sendo a temperatura inicial de 50 °C elevada a cada 50 °C depois de 30 min que o digestor atingia o valor programado. Os tubos permaneceram na capela até que apresentassem coloração azul/verde claro. Na digestão, o nitrogênio é transformado em amônio e os compostos orgânicos são convertidos principalmente em CO_2 e H_2O .

As amostras foram destiladas utilizando destilador de nitrogênio TE-0363 (Marca Tecnal, Piracicaba, Brasil®). Os tubos com as amostras já frias receberam aproximadamente 5 mL de água destilada, 3 gotas de indicador vermelho de metila ($\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$) e posteriormente foram acoplados ao destilador de nitrogênio. No destilador acoplou-se um erlenmeyer contendo 10 mL de ácido bórico (H_3BO_3), solução receptora. Pelo funil do equipamento acrescentou-se aproximadamente 15 mL de hidróxido de sódio (NaOH), até que acontecesse a viragem e liberação da amônia. As amostras permaneceram em destilação até que se obtivesse 100 mL de uma solução de

coloração esverdeada. No processo de destilação, a amônia é separada e recolhida na solução receptora.

A titulação da amostra foi feita com ácido clorídrico (HCl) 0,02 N, contido em uma bureta com capacidade para 25 mL, adicionando o ácido até que a solução voltasse à coloração rósea. A solução titulada manteve-se em agitação durante todo o processo com auxílio de agitador magnético. Nessa fase ocorreu a determinação quantitativa da amônia contida na solução receptora.

Os dados foram submetidos a análises quantitativas de nitrogênio, a partir da seguinte fórmula:

$$\%N = V \times N \times F \times 0,014 \times 100/ m$$

onde: N = normalidade do ácido clorídrico, 0,02 N; F = fator de correção do ácido clorídrico = 1,00; 0,014, miliequivalente-grama do nitrogênio; V= volume do ácido clorídrico gasto na titulação, em mL; m = peso da amostra, em g.

2.3.6. Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos em um Espectrofotômetro FT-IR/NIR FRONTIER (Marca Perkin Elmer, Waltham, Estados Unidos®), utilizando acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR), empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe), resolução de 4 cm⁻¹ e média aritmética de quatro varreduras, na região entre 500 e 4000 cm⁻¹.

3. Resultados e Discussão

As caracterizações realizadas a seguir visaram aprofundar o conhecimento sobre cera de carnaúba tipo 1 e ureia isolados e associados para usá-los em sinergia, tendo como propósito a proteção da ureia para liberação controlada. Estudaram-se três níveis de inclusão de matriz lipídica e ureia para formação dos microencapsulados, sendo nas proporções 2:1; 3:1 e 4:1, onde por conveniência serão reportados como U_{ME2}; U_{ME3} e U_{ME4}, respectivamente.

Com o intuito de averiguar a viabilidade da liofilização, técnica de microencapsulação empregada neste estudo, foi avaliado o rendimento do processo de

obtenção das formulações microencapsuladas. Os valores desta variável encontram-se abaixo, na Figura 1.

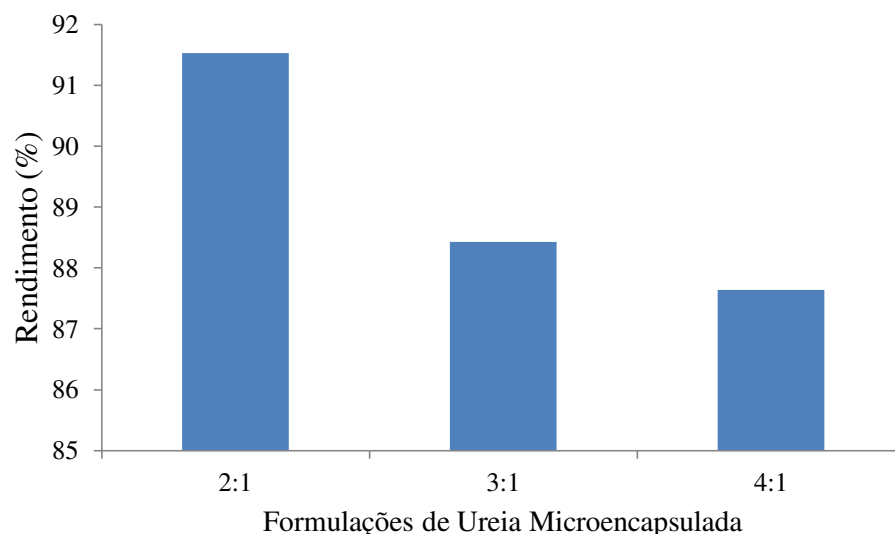


Figura 1. Análise de rendimento de encapsulamento das formulações (2:1; 3:1 e 4:1).

Analisando os dados acima, verificou-se que todas as U_{ME} 's apresentaram alto rendimento, com valores de 91,6; 88,4 e 87,8% para U_{ME2} , U_{ME3} e U_{ME4} , respectivamente. Esses resultados indicam ser adequada a escolha da técnica de liofilização para microencapsular ureia utilizando cera de carnaúba como material de parede, comprovando uma menor perda de material durante o processamento.

O maior valor de rendimento foi observado para a menor concentração de cera de carnaúba 2:1, o que pode ser explicado pela sua menor quantidade de cera, o que possibilita uma consequente redução na perda de material durante o preparo das formulações, onde parte da mistura fica aderida aos recipientes. Apesar da liofilização permitir elevados rendimentos e da diferença não ter sido considerável entre as formulações, a mesma não chega a 100% devido às perdas prévias, ocorridas durante as transferências de recipientes e se intensificando com o aumento da proporção de cera no sistema, o que pode ser justificado pelo aumento na viscosidade da emulsão.

As determinações de nitrogênio permitiram estimar o teor equivalente de proteína bruta, determinar a porcentagem real de ureia nas formulações e, portanto, investigar a eficiência do processo. Os resultados obtidos encontram-se abaixo na Tabela 1.

Tabela 1. Quantificação do nitrogênio total, proteína bruta, teor teórico de ureia, teor real médio de ureia e eficiência da encapsulação.

Formulação U_{ME}	Ntotal (%)	Proteína bruta (%)	Teor teórico de Ureia (%)	Teor real médio de Ureia (%)	Eficiência da encapsulação (%)
2:1	14,79 ± 0,01	92,44 ± 0,10	33,33	33,18 ± 0,04	99,56 ± 0,11
3:1	11,08 ± 0,226	69,25 ± 1,414	25,00	24,86 ± 0,509	99,44 ± 2,036
4:1	8,63	54,55 ± 0,884	20,00	19,58 ± 0,318	97,92 ± 1,591

As formulações U_{ME2}, U_{ME3} e U_{ME4} apresentaram teor de proteína bruta de 92,44; 69,25 e 54,55%, respectivamente. Analisando os valores expostos acima, nota-se que no geral as formulações tiveram alta eficiência de microencapsulação, estando todas acima de 97%, destacando-se a primeira concentração (U_{ME2}), onde se obteve maior valor de eficiência e com um reduzido desvio padrão.

Avaliando os excelentes resultados apresentados na análise de eficiência da encapsulação, ressalta-se a qualidade na capacidade de retenção que a cera de carnaúba possui, visto que conseguiu reter praticamente todo o conteúdo nitrogenado inserido como núcleo, demonstrando sua alta elegibilidade para uso como material de parede graças ao seu alto poder de retenção.

Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível avaliar a morfologia da superfície de cada fase isolada e também nos sistemas microencapsulados. As micrografias encontram-se reunidas na Figura 2 abaixo.

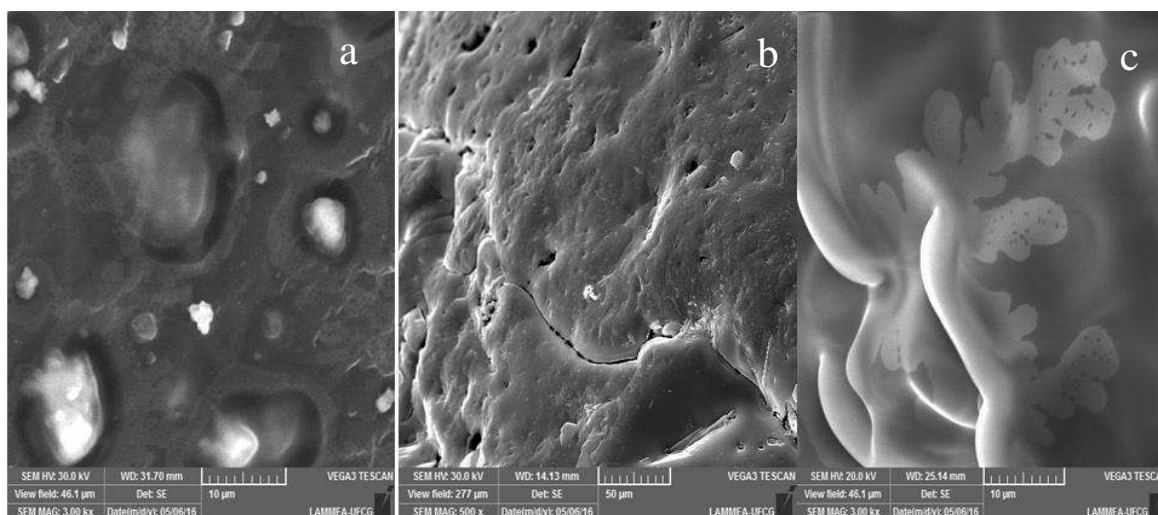


Figura 2. Micrografias eletrônicas de varredura: a) Cera de Carnaúba, b) Ureia e c) Ureia de liberação controlada.

Observou-se que a cera de carnaúba apresentou uma superfície irregular, porém íntegra, selada, sem porosidade e com algumas marcas bastante peculiares. Já a ureia, apresentou superfície rugosa, porosa e com fissuras. Os três sistemas microencapsulados apresentaram microestrutura semelhante entre si, por esta razão foi escolhida uma micrografia com melhor nitidez para representá-los, em que as marcas características da cera de carnaúba foram de grande valia para confirmar a proteção da ureia, visto que a cera apresentou-se como única fase externa visível, indicando o êxito do processo de microencapsulação.

O êxito do uso da cera de carnaúba para incorporação de materiais também foi reportado na literatura, em que a mesma foi empregada na hidrofobização de betonita, vermiculita e diatomita estudadas por Borba et al. (2013), já Stojakovic et al. (2012) concluíram que a cera de carnaúba pode ser utilizada como microencapsulante para a valina.

A determinação da umidade e atividade de água foram feitas nos materiais isolados e nas U_{ME} 's imediatamente após liofilização e a determinação de umidade foi repetida após 5 meses de estocagem sob temperatura de 26 °C e 42% de umidade.

Tabela 2. Valores obtidos para umidade após o preparo e após 5 meses de estocagem e atividade de água da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1 e 4:1).

Ingrediente	Umidade (%)		Atividade de água (Aw)/Temperatura (°C)
	Após preparo	Após 5 meses de estocagem	
Ureia	4,94 ±0,06	8,27 ±2,02	0,603 ± 0,002/ 26,7 ±0,141
Cera	<1%		-
2:1	4,88 ± 0,16	4,88 ± 0,17	0,561 ± 0,002/ 26,45 ± 0,21
3:1	2,01 ± 0,57	2,01 ± 0,57	0,512 ± 0,014/ 27,10 ± 0,56
4:1	1,81	1,81	0,524 ± 0,018/ 26,4

Estudando os dados de umidade dos materiais isolados e os compostos formados por ambos, observou-se uma diminuição com o aumento do teor de cera de carnaúba, devido à alta hidrofobicidade desta. Já ao longo do período de armazenamento, a ureia livre apresentou aumento no teor de umidade, provavelmente devido à sua natureza higroscópica, enquanto as U_{ME} 's mantiveram o teor de umidade inicial. Em relação aos resultados de atividade de água, todas as formulações apresentaram valores que indicam um sistema microbiologicamente estável e seguro, sem risco de deterioração.

Logo, mais uma vantagem do uso da cera de carnaúba como material de parede para encapsular ureia é a sua capacidade de inibir a retenção de umidade do constituinte nitrogenado do núcleo, o que beneficia o produto, impedido sua petrificação durante o armazenamento e facilitando a homogeneização na dieta quando fornecido no cocho aos animais.

A análise de FTIR foi realizada a fim de avaliar a compatibilidade entre o encapsulante e o núcleo, e ainda averiguar se há reações que possam vir a interferir negativamente sobre o sistema. Esta técnica permite confirmar a presença dos materiais em questão (Ureia e Cera de Carnaúba) após o processo de microencapsulação, através da observação de seus principais grupamentos químicos nas regiões do infravermelho. Os dados foram interpretados, tomando por base Borba et al., (2013), e Barros et al., (2016). Os espectros na região do infravermelho da ureia (U), cera de carnaúba (CC) e das diferentes formulações de U_{ME} 's (2:1, 3:1 e 4:1) estão na Figura 3 a seguir.

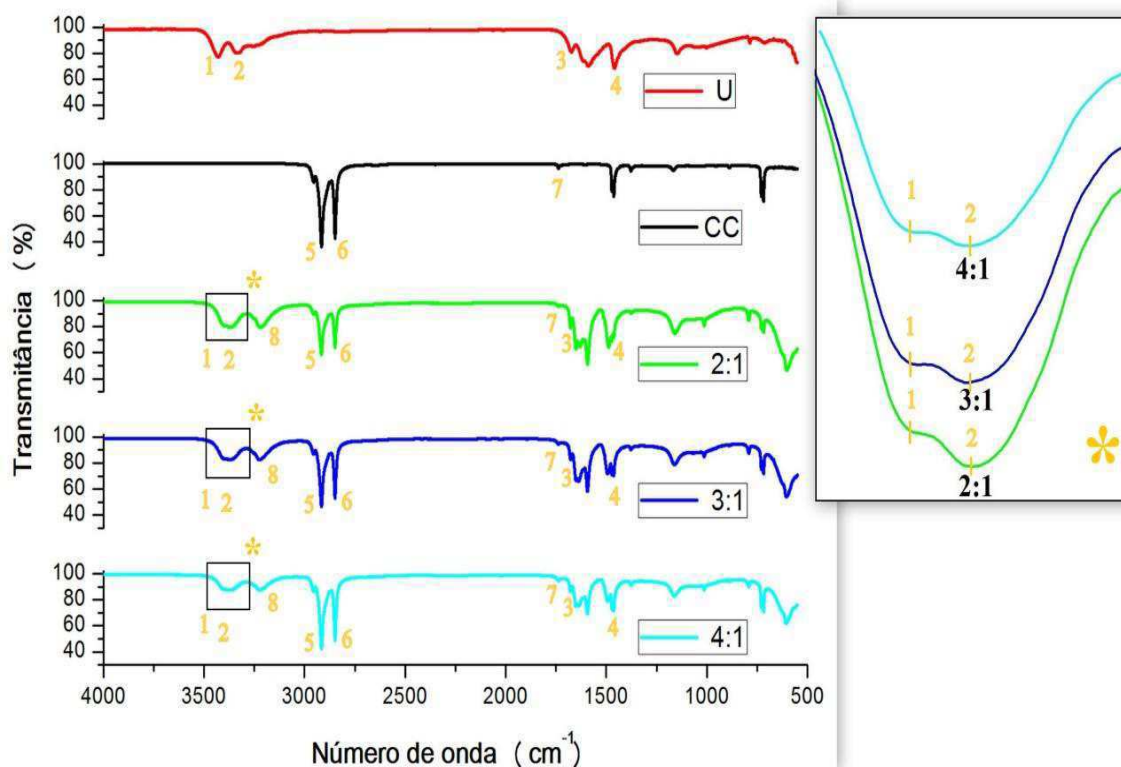


Figura 1. Espectrogramas FTIR da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1 e 4:1).

Verificou-se que a ureia apresentou bandas de absorção localizadas em 3430 e 3332 cm^{-1} (Bandas 1 e 2) que correspondem, respectivamente, à vibração assimétrica e simétrica da ligação N-H, além de bandas em 1673 (Banda 3) e 1460 cm^{-1} (Banda 4), referentes aos grupamentos C=O e C-N, respectivamente.

Já a cera de carnaúba apresentou bandas de absorção características em 2915 e 2847 cm^{-1} (Bandas 5 e 6), atribuídas ao estiramento simétrico e assimétrico das ligações C-H, além da banda 1773 cm^{-1} (Banda 7), referente ao grupamento C=O da cera.

No que diz respeito aos sistemas microencapsulados, de maneira geral, os espectros apresentaram uma junção das bandas das fases isoladas (Ureia e cera). No entanto, as bandas relativas à ureia apresentaram alteração de frequência, em que a mais considerável ocorreu para as bandas do grupamento N-H, observando-se, inclusive, um início de sobreposição delas, conforme ampliação nesta região do espectro. Tal fato deve-se à facilidade da ureia em estabelecer interações intermoleculares de H, não trazendo prejuízos à integridade do sistema. Observou-se que as principais bandas de absorção típicas da cera de carnaúba não sofreram alteração, indicando que esta não

interage com os grupamentos da ureia. Na literatura consultada (BARROS, et al., 2016), não foi reportada alteração para esta região do infravermelho para ureia dentro do produto protegido, o que pode ser atribuído à diferença nos constituintes do sistema. A banda de absorção observada em 3224 cm⁻¹ (Banda 8) para os sistemas microencapsulados corresponde ao grupamento O-H da água, cuja presença foi atestada nos resultados de umidade já apresentados e a qual pode também ter interagido com a ureia nos sistemas.

Tomando por base as constatações supracitadas, pode-se confirmar a presença da ureia nas formulações microencapsuladas, o que atesta a incorporação deste ingrediente nitrogenado na matriz lipídica. Visto isso, prova-se a manutenção da integridade das fases após o processamento, pois não foram reativos, confirmando a elegibilidade desta matriz lipídica de carnaúba para encapsular ureia, pois há compatibilidade química. As principais bandas observadas e suas respectivas atribuições estão reunidas na Tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Bandas de absorção de FTIR da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1 e 4:1).

MATERIAL	1	2	3	4	5	6	7	8
U	3430	3332	1673	1460	-	-	-	-
CC	-	-	-	-	2915	2847	1737	-
U _{ME2}	3400	3370	1677	1463	2915	2847	1737	3224
U _{ME3}	3400	3372	1676	1462	2915	2847	1737	3224
U _{ME4}	3400	3374	1676	1462	2915	2847	1737	3224
Atribuição	N-H	N-H	C=O	C-N	C-H	C-H	C=O	O-H

A Termogravimetria foi empregada para avaliar o comportamento térmico de todas as amostras no estudo. Na Figura 4 abaixo, encontram-se as curvas termogravimétricas das fases isoladas e microencapsuladas.

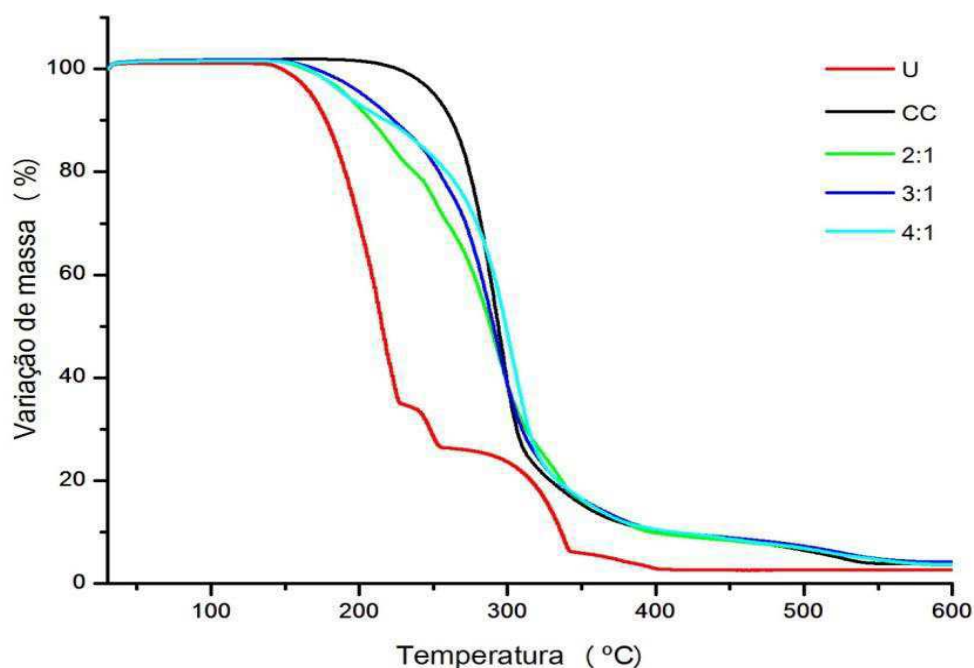


Figura 2. Curvas termogravimétricas (TG) da Ureia, Cera de Carnáúba e Formulações (2:1; 3:1; 4:1).

A Termogravimetria é uma técnica termoanalítica destrutiva, que visa registrar a variação de massa em função do tempo ou temperatura, sendo importante para validar o conhecimento sobre a estabilidade térmica de materiais.

A T_{onset} da cera de carnaúba tipo 1 em estudo foi de 262,24 °C. Já a ureia apresentou T_{onset} em 174,51 °C, estando de acordo com o descrito na literatura, onde encontrou-se o T_{onset} da ureia de 185 °C (JONES e ROLLINSON, 2013) e estando dentro do intervalo descrito por Fernandes et al. (2015) que encontrava-se entre 135 e 250 °C.

Para $U_{\text{ME}2}$, $U_{\text{ME}3}$ e $U_{\text{ME}4}$, a T_{onset} foi 234,11; 248,80 e 259,50 °C, respectivamente. Observou-se, portanto, que os sistemas microencapsulados apresentaram maior estabilidade quando comparados à ureia isolada, o que confirma a efetividade da proteção do núcleo pela cera de carnaúba. As curvas TG das U_{ME} 's se assemelham ao da cera de carnaúba, indicando que é esta última que inicialmente responde à ação da temperatura, evidenciando o êxito do processo de microencapsulação e a blindagem do núcleo, em conformidade com o observado anteriormente nas micrografias. Outra constatação importante é que quanto maior foi o teor de cera inserido no sistema, maior a T_{onset} .

Diferentemente da TG, a Calorimetria exploratória diferencial (DSC) não baseia-se na variação de massa, mas sim de entalpia. É uma técnica de grande valia para complementar a Termogravimetria, visto que, agora poder-se-á identificar com propriedade as mudanças de fases sem que haja variação de massa, o que passaria despercebido puramente por TG, como mudanças estruturais, reações e transições sólido-sólido, cristalização, fusão, polimerização, reações catalíticas, entre outros.

A técnica de DSC possibilitou determinar a temperatura de fusão, fator de grande influência em um sistema de liberação controlada em que o encapsulante é um cerídeo, fornecendo informações, inclusive, acerca da estabilidade e das adequadas condições de armazenamento do material. As curvas de DSC da ureia, cera de carnaúba e U_{ME} 's encontram-se na Figura 5 a seguir.

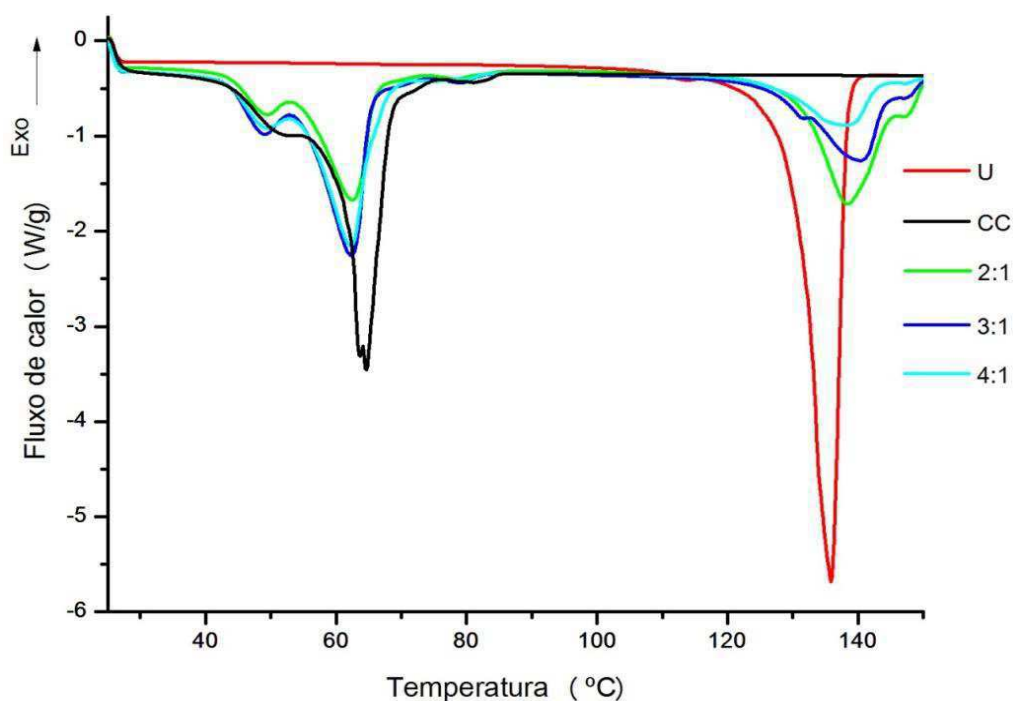


Figura 3. Curvas de DSC da Ureia, Cera de Carnaúba e Formulações (2:1; 3:1; 4:1).

As curvas de DSC apresentaram apenas eventos endotérmicos para cera de carnaúba, ureia e formulações microencapsuladas, atribuídos à fusão. A cera de carnaúba apresentou ponto de fusão de 64,61 °C, enquanto a ureia 135,83 °C. O ponto de fusão da ureia está condizente com o que a literatura reporta que está entre 125 e 150 °C (FERNANDES et al., 2015), já o ponto de fusão da cera de carnaúba difere do encontrado na literatura, que revela temperatura de 83,9 °C (LACERDA et al., 2011).

Esta variação pode ser atribuída a diferentes formas de processamento, época de colheita da cera, clima, idade da planta, solo, entre outros.

Avaliando as curvas de DSC referentes às U_{ME} 's, identificou-se que o ponto de fusão das mesmas foi semelhante entre si, com valores de 62,42; 62,35 e 62,20 °C para U_{ME2} , U_{ME3} e U_{ME4} , respectivamente. Esse resultado atesta que não houve redução considerável na temperatura de fusão dos sistemas, quando comparados ao ponto de fusão da cera isolada. Fases puras geralmente sofrem alteração no ponto de fusão ao serem misturadas com um componente com o qual interagem, porém a manutenção da temperatura de fusão nas U_{ME} 's em relação à cera de carnaúba é de grande importância, considerando que uma diminuição brusca poderia comprometer a integridade do material durante armazenamento, principalmente em regiões onde as temperaturas são elevadas. Já na faixa de temperatura em que a ureia funde, constatou-se para U_{ME2} , U_{ME3} e U_{ME4} a ocorrência de fusão em 138,49; 140,38 e 138,04 °C, respectivamente, mostrando que houve um aumento, mesmo que discreto, na temperatura de fusão da ureia nas U_{ME} 's em comparação com a ureia isolada, o que indica que, ainda que fundida, a cera de carnaúba é capaz de proteger o núcleo. Essas constatações estão em concordância com os resultados das demais técnicas já apresentadas no que diz respeito à ocorrência e efetividade da microencapsulação, além da compatibilidade química.

4. Conclusão

De maneira geral, a presente pesquisa investigou o uso da cera de carnaúba como matriz encapsulante de ureia. Para tal, foram obtidos três sistemas microencapsulados pela técnica de Liofilização, com diferentes proporções entre núcleo e encapsulante. As formulações não diferiram muito entre si e todas apresentaram excelentes propriedades, incluindo a inibição da higroscopicidade da ureia, com destaque para a formulação 1:2, que exibiu os maiores valores de rendimento e maior eficiência de microencapsulação, o que é bastante desejável, visto que é o sistema com maior teor de ureia entre os estudados, enquanto a formulação 1:4 apresentou maior T_{onset} e menor teor de umidade. A obtenção de microesferas de ureia utilizando a cera de carnaúba demonstrou resultados exitosos para todos os sistemas microencapsulados desenvolvidos,

evidenciando o potencial promissor de uso desta matéria-prima, típica do semiárido, para tal finalidade.

5. Referências

AOAC, **Association of Analytical Chemists. Official Methods of Analysis.** 14th Edition Washington DC, 2012.

AZEVEDO, E. B.; PATIÑO, H. O.; SILVEIRA, A. L. F.; LÓPEZ, J.; BRÜNING, G.; KOZLOSKI, G. V. Incorporação de ureia encapsulada em suplementos proteicos fornecidos para novilhos alimentados com feno de baixa qualidade. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1381-1387, 2008.

BARROS, A.A.; SANTOS, R.; CARDOSO, G. Caracterização química e morfológica de mistura de ureia com vermiculita encapsulada em derivado celulósico. **Scientia Plena.** v.12 n.8, 2016.

BARTLEY, E.E.; DEYOE, C. W. Starea as a protein replacer for ruminants. A review of 10 years of research. **Feedstuffs**, v.47, p.42-44, 1975.

BORBA, L.L.S.; OLIVEIRA, M.F.D.; MELO, M.A.F.; MELO,D.M.A.; PERGHER, S.B.C. Preparação de adsorventes à base de materiais naturais hidrofobizados com cera de carnaúba. **Perspectiva, Erechim.** v.37, n.139, p. 37-46, setembro de 2013.

CASS, J. L.; RICHARDSON, C. R. In vitro ammonia release from urea/calcium compounds as compared to urea and cottonseed meal. **National Research Technology Report.** T-5-342, Texas Tech University, 1994.

CASTAÑEDA-SERRANO, R.D.; FERRIANI-BRANCO, A.; TEIXEIRA, S.; GARCIA-DIAZ, T.; DIEGO-SOFIATI, A. Slow release urea in beef cattle diets: digestibility microbial synthesis and rumen kinetic. **Agrociencia.** v.47, p.13-24, 2013.

FERNANDES, B.S.; PINTO, J.C.; CABRAL-ALBUQUERQUE, E.C.M.; FIALHO, R.L. Free-Radical polymerization of urea, acrylic acid, and glycerol in aqueous solutions. **Polymer Engineering and Science**, p.1219-1229, 2015

FORERO, O.; OWENS, F. N.; LUSBY K. S. Evaluation of slow-release urea for winter supplementation of lactating range cows. **Journal of Animal Science**, v.50, p.532-538, 2001.

GALO, E., S. M. EMANUELE, C. J. SNIFFEN, J. H. WHITE AND J. R. KNAPP. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v.86, p.2154-2162, 2003.

HAINES, P.J. **Principles the Thermal Analysis and Calorimetry**, The Royal Society of Chemistry, 2002.

HUNTINGTON, G.B.; HARMON, D.L.; KRISTENSEN, N.B.; HANSON, K.C.; SPEARS, J.W. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. **Animal Feed Science and Technology**. v.130, p.225-241, 2006.

LACERDA, S.P.; CERIZE, N. N. P.; RÉ, M. I. Preparation and characterization of carnauba wax nanostructured lipid carriers containing benzophenone-3. **International Journal of Cosmetic Science**, v.33, p.312–321, 2011.

LÖEST, C. A.; TITGEMEYER, C. E.; LAMBERT, B. D.; TRATER, A. M. Branched-chain aminoacids for growing cattle limited-fed soybean hull-based diets. **Journal of Animal Science**. v.79, p.2747-2753, 2001.

PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n.4, p.491-502, out./dez., 2007.

PROKOP, M. J.; KLOPFENSTEIN. T. J. **Slow ammonia release urea**. Nebraska Beef Cattle Report. EC 77-218, 1997.

RODRIGUES, D.C.; CACERES, C.A,RIBEIRO, H.L.; ABREU, R.F.A.; CUNHA .A.P.; AZEREDO, H.M.C. Influence of cassava starch and carnauba wax on physical properties of cashew tree gum-based films. **Food Hydrocolloids**. v.38, p.147-151, 2014

STOJAKOVIC, D.; BUGARSKI, B.; RAJIC, N. A kinetic study of the release of vanillin encapsulated in Carnauba wax microcapsules. **Journal of Food Engineering** v.109, p.640–642, 2012.

VARELA, M.C.; CARVALHO, R.G. Viabilidade ambiental para a criação de unidades de conservação na Ilha da Coroa, Mossoró – RN. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v.21, n.2, p.7-21, ago. 2009.

CAPÍTULO 2 - Cinética de degradação, perfil e mecanismo de liberação de ureia microencapsulada em cera de carnaúba

Cinética de degradação, perfil e mecanismo de liberação de ureia microencapsulada em cera de carnaúba

Resumo

Objetivou-se com esse trabalho avaliar as ureias de liberação lenta microencapsuladas em matriz de cera de carnaúba, sendo três sistemas nas proporções entre núcleo e encapsulante (1:2, 1:3 e 4:1), quanto a cinética de degradação *in situ*, perfil de liberação de nitrogênio e mecanismo de liberação do núcleo em pequenos ruminantes. A cinética demonstrou que o aumento da proporção de cera reduziu não só a degradação, mas também o aproveitamento da ureia, como pode ser comprovado também no perfil de liberação, onde a U_{ME2} apresentou uma liberação mais controlada que as demais U_{ME}'s estudadas. A cera de carnaúba propiciou uma maior biodisponibilidade da ureia, reduzindo o risco de intoxicação. Os principais mecanismos de liberação foram a difusão e a biodegradação, fato que impediu o aproveitamento completo do N, mas não diminuiu a taxa de liberação. O comportamento das granulometrias estudadas demonstrou que o aumento do tamanho da partícula tende a regular melhor a taxa de liberação do N, sendo mais eficaz que acrescentar cera ao sistema. Desta forma conclui-se que a cera de carnaúba é uma alternativa promissora para liberação gradual de ureia, sendo apontada a concentração 1:2 como a mais favorável.

Palavras chave: biodisponibilidade, difusão, gradual, intoxicação

Abstract

The objective of this work was to evaluate the microencapsulated slow release urea in a carnauba wax matrix, with three systems in the ratio between core and encapsulant respectively (1:2, 1:3 and 1:4), regarding to kinetics degradation *in situ*, nitrogen release profile and mechanism of release of the core in small ruminants. The kinetics showed that the increase of the wax content not only affected the degradation, but also the urea utilization, as can be seen in the release profile, in which U_{ME2} showed a more controlled release than the other U_{ME}'s studied. Carnauba wax provided a higher bioavailability of urea, reducing the risk of intoxication. The main mechanisms of release were diffusion and biodegradation, a fact that prevented the complete use of N,

but did not decrease the rate of release. The behavior of the granulometries studied showed that the increase of the particle size tends to regulate the rate of N release better, being more effective than adding wax to the system. Thus, it is concluded that carnauba wax is a promising alternative for the gradual release of urea, with the concentration 1:2 being the most favorable.

Keywords: Bioavailability, diffusion, gradual, intoxication

1. Introdução

A ureia é uma fonte de nitrogênio não proteico (NNP) bastante empregada na dieta de ruminantes, possuindo baixo custo por unidade de nutriente, e alto equivalente proteico de 281% (CASTAÑEDA-SERRANO et al., 2013) configurando uma importante alternativa para substituição parcial da proteína oriunda de alimentos de origem vegetal encontrada nos farelos e tortas vegetais.

Ao ser ingerida pelo animal, a ureia é rapidamente hidrolisada, porém quando os níveis de amônia absorvidos pelo rúmen, ultrapassam o limite do fígado de biotransformá-la em ureia novamente, ocorre acúmulo da mesma na corrente sanguínea, causando intoxicação conhecida como Alcalose Ruminal e com possibilidade de levar o animal ao óbito (AZEVEDO et al., 2008).

A considerável atividade ureolítica do rúmen, somada à necessidade de adaptação dos animais à alimentação com ureia, têm motivado estudos para desenvolver produtos que possibilitem a liberação gradativa da ureia no ambiente ruminal (HUNTINGTON et al., 2006).

Através de determinados processamentos industriais, pode-se reduzir a velocidade de degradação da ureia no rúmen e diversas tecnologias têm sido testadas nas últimas décadas, incluindo a amireia (BARTLEY e DEYOE, 1975), ureia tratada com formaldeído (PROKOP & KLOPFENSTEIN, 1977), proteção com gordura (FORERO et al., 1980), proteção com biureto (LÖEST et al., 2001), ureia líquida e cloreto de Ca (CASS & RICHARDSON, 1994) e também ureia encapsulada com polímero (GALO et al., 2003). Um dos obstáculos a serem contornados é que as alternativas encontradas são geralmente mais caras do que a ureia (AZEVEDO et al., 2008) ou apresentam alguma outra limitação.

A cera de carnaúba consolida-se como uma alternativa interessante para encapsular essa fonte de NNP, por ser um composto inerte, insolúvel em água devido sua característica hidrofóbica (PEZZINNI et al., 2007) e portanto, alternativa viável para proteger a ureia que é solúvel. Apesar da toxicidade de alguns lipídeos aos microorganismos do rúmen, a cera de carnaúba é inerte para a saúde ruminal e animal por ser um lipídeo saturado de cadeias longas de ésteres ser um produto natural e nativo de uma palmeira brasileira *Copernicia cerifera* (RODRIGUES et al., 2014) contida no bioma caatinga (VARELA e CARVALHO, 2009).

Considerando os desafios da administração da ureia devido à alta atividade ureolítica do rúmen e ao mesmo tempo a importância da sua utilização, principalmente no semiárido nordestino, em que no período das constantes secas as forrageiras apresentam baixos níveis de proteína, e levando em conta ainda a relevância de explorar sustentavelmente o potencial tecnológico da biodiversidade, em especial a regional, hipotetizou-se a elaboração de uma fonte de NNP de liberação lenta, através da microencapsulação de ureia em matriz lipídica de cera de carnaúba, utilizando a liofilização como método de secagem. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho avaliar as ureias de liberação lenta microencapsuladas em matriz de cera de carnaúba quanto à cinética de degradação *in situ*, perfil de liberação de nitrogênio e mecanismo de liberação do núcleo em pequenos ruminantes.

2. Material e Métodos

2.1. Local do experimento

Os sistemas microencapsulados foram processados no laboratório de nutrição animal (LANA) da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG no Centro de Saúde e Tecnologia Rural / CSTR no município de Patos – PB.

O ensaio experimental foi desenvolvido no Setor de Caprinos e Ovinos da Fazenda Experimental NUPEÁRIDO do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG no município de Patos – PB. Os animais foram distribuídos em baias individuais providas de sombra artificial com telhas de amianto, piso de alvenaria na parte sombreada e de chão batido na parte

exposta ao sol. A cumeeira orientada no sentido leste-oeste. As baias tinham dimensão de 0,80 m de largura x 5 m de comprimento, cercada com arame galvanizado liso.

2.2. Obtenção da ureia microencapsulada

Três formulações de ureia microencapsulada em matriz lipídica de cera de carnaúba foram desenvolvidas, em que as proporções (m/m) entre núcleo e encapsulante foram de 1:2; 1:3 e 1:4, respectivamente. As etapas de preparo a seguir foram definidas em testes prévios.

Para preparar as emulsões que resultaram nos produtos microencapsulados utilizados nos experimentos e caracterizações iniciais, as respectivas massas de ureia correspondentes a cada formulação foram pesadas em balança analítica Adventurer AR2140 (Marca Ohaus, Parsippany, Estados Unidos®) em béqueres separados, dissolvidos com água destilada até total dissolução. Em seguida, a cera de carnaúba foi pesada em béqueres diferentes e fundida em banho maria, sob temperatura de 85 °C. Logo após, teve início o preparo propriamente dito das emulsões, que foi feito a quente em banho maria sob temperatura de 85 °C, devido à rápida solidificação da cera, uma vez que seja retirada do aquecimento.

Ao béquer contendo a cera fundida foi adicionado Span 80 - Mono-oleato de sorbitano (Volume correspondente a 5% com base na massa de cera de carnaúba), um estabilizante e emulsificador próprio para formulação de emulsões do tipo fase aquosa dispersa em fase oleosa (A/O), alvo do estudo. Antes de ser adicionada, a solução de ureia foi aquecida até a temperatura da cera fundida e, posteriormente, adicionada lentamente à cera, sob agitação constante de 120 rpm durante 20 min, com bastão de vidro. Por fim, as emulsões foram transferidas para recipientes plásticos, identificadas, congeladas em freezer horizontal a -25 °C por 24 h. Após esse período, as emulsões congeladas foram submetidas a secagem principal em liofilizador Alpha 1-4 LD Plus (Marca Christ, Osterode am Harz, Alemanha®), sob pressão de 0,11 mbar e temperaturas de -60 °C por 24 h, seguida de secagem complementar em estufa a 55 °C por 6 h.

Para obtenção do material com tamanho de partículas que pudessem ser adicionadas à ração, após desidratação, o produto foi dividido em dois grupos, sendo o

primeiro (grupo A) submetido à maceração com almofariz e pistilo até obtenção de pó homogêneo com granulometria de até 32 mesh (P_p) e um segundo (grupo B) que foi macerado em peneira de 20 mesh (P_m), com auxílio de pistilo para conseguir uma partícula maior e mais uniforme. Todos os produtos foram acondicionados a temperatura ambiente.

2.3. Animais, manejo e delineamento experimental

Este estudo foi realizado em estrita conformidade com as recomendações contidas no Guia do Conselho Nacional de Controle de Experiências em Animais (CONCEA). O protocolo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentos com Animais da Universidade Federal de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil (Número de Permissão: 070/2016).

Foram utilizados quatro ovinos machos castrados, adultos com peso médio de 70 ± 2 kg, providos de cânula ruminal. Os animais foram alojados em baias individuais com 4 m^2 de área coberta e providas de comedouros e bebedouros individuais.

A alimentação contendo os microencapsulados foi fornecida aos animais em dois horários (7:00 e 16:00 h), sendo 50% oferecido pela manhã e o restante à tarde, de modo a atender às necessidades de ingestão média diária, com uma dieta à base de 60% de volumoso (feno moído de capim andrequicé) e 40% de concentrado (milho moído + ureia). A água era fornecida *ad libitum*.

O ensaio experimental foi conduzido em um delineamento inteiramente ao acaso, em arranjo fatorial (3×2), relações de núcleo (N) e encapsulante (cera), 1:2; 1:3 e 1:4 (U_{ME2} ; U_{ME3} e U_{ME4}) e tamanho de partículas (P_p e P_m), com parcela subdividida no tempo (0; 15; 30; 60; 120; 240 e 360 min) e quatro repetições atribuídas a cada animal. Os ensaios experimentais foram de 8 dias, sendo 7 dias de adaptação dos animais à dieta contendo 1% de ureia e um dia para realização da cinética. Entre um ensaio experimental e outro, os animais eram soltos para terem repouso de 5 dias.

2.4. Cinética da degradação *in situ*

Para determinação das degradabilidades potenciais da matéria seca (MS) e nitrogênio (N) das três U_{ME}'s desenvolvidas para este estudo, foi adotada a técnica *in situ*, proposta por Mehrez e Ørskov (1977). Amostras dos três níveis de U_{ME} foram colocadas, na quantidade de aproximadamente 1 g, em sacos de TNT (polipropileno), que mediam 5 × 6 cm, com porosidade de 50 µm, fechados a quente em máquina seladora. Cada saco e amostra foram secados em estufa com ventilação forçada a uma temperatura de 55 °C, durante 24 h e pesados para ser conhecido o valor do peso do saco (tara) e da matéria seca da amostra.

Durante o período de incubação (6 h) foram colocadas as amostras em duplicata para cada animal, nos respectivos intervalos de tempo (0; 15; 30; 60; 120; 240 e 360 min) e acrescido de 1 branco, contabilizando 7 sacos por intervalo de tempo, em cada animal e totalizando 196 saquinhos (devidamente identificados com grafite). Vinte e oito destes como controle (brancos), utilizados para determinar o conteúdo ruminal que se adere aos saquinhos para posterior correção da matéria seca, os demais sacos corresponderam a 3 tratamentos com as três U_{ME}'s produzidas para esse estudo, duas granulometrias estudadas em diferentes períodos de tempo e por cada tratamento. Depois de pesados, os sacos foram colocados em uma sacola de filó (15 cm × 30 cm), juntamente com um pequeno peso de chumbo de 100 g e amarrado com um fio de náilon à cânula, sendo depositados na massa ventral do rúmen de maneira invertida, colocando-se primeiro as amostras do tempo final, 360 min, e gradativamente colocando as demais, de forma que o conteúdo passasse o seu tempo devido no rúmen e que ao final fossem retirados todos de uma só vez. Os sacos referentes ao tempo zero (utilizados para se determinar a fração prontamente solúvel) foram introduzidos na água por 20 s e imediatamente retirados, recebendo então o mesmo tratamento que os demais.

Após o período de incubação os sacos com os resíduos foram removidos e imersos em banho de água gelada, para matar as bactérias e interromper a degradação, em seguida lavados com água abundante e secos em estufa a 55 °C durante 24 h.

Para a descrição da cinética de degradação *in situ* da matéria seca e nitrogênio dos diferentes tratamentos de U_{ME}, utilizou-se o modelo exponencial de Ørskov e McDonald, (1979):

$$DP = a + b [1 - e^{(-c.t)}],$$

onde a DP é a degradação potencial no tempo t;

- a, fração rapidamente solúvel em água;
- b, fração insolúvel em água, mas potencialmente degradável;
- c, taxa de degradação da tração b; e
- t, tempo de incubação em horas.

Os parâmetros do modelo de Ørskov e McDonald (1979) foram estimados por ajuste das curvas de degradação, utilizando-se a linearização pelo uso do logaritmo neperiano.

A degradabilidade potencial foi obtida por:

$$DP = a + b$$

A fração potencialmente indegradada (i) foi determinada como:

$$i = 100 - (a + b)$$

A degradabilidade efetiva ou teórica de MS e N dos diferentes tratamentos de U_{ME}, foi calculada pela equação:

$$DE = a + [(b \times c)/(c + k)]$$

em que DE é degradabilidade efetiva e

k, taxa de passagem de partículas no rúmen.

As degradabilidades efetivas da MS e N das U_{ME}'s 1:2; 1:3 e 1:4 foram calculadas utilizando-se valor único de taxa de passagem de partículas no rúmen-retículo de 8%/h.

2.5. Perfil e mecanismo de liberação da Ureia microencapsulada

Após a digestão, secagem e pesagem das U_{ME}'s incubadas foi determinado o perfil de liberação de Nitrogênio e estudado o seu mecanismo de liberação. As análises de nitrogênio, parâmetro que foi utilizado para determinação da taxa de liberação nos testes *in situ*, foram feitas de acordo com o método de *Kjeldahl*, descrito por AOAC (2012).

Para estudar o mecanismo de liberação foi avaliada a microestrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias dos sistemas microencapsulados antes do teste *in situ* foram obtidas conforme mencionado na subseção 2.3.1 do capítulo 1 do presente estudo. Para obtenção das micrografias, os produtos encapsulados foram previamente cobertos por uma fina camada de ouro no

metalizador Q150R ES (Quorum, Lewes, Inglaterra®). Para tal, as amostras foram fixadas com fita de carbono, o tempo de metalização foi de 3 min, sob amperagem de 10 mA. As micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura SSX-550 (Shimadzu, Quioto, Japão®), com voltagem de aceleração de 20 kV.

2.6. Análises estatísticas

Para a cinética de degradação *in situ*, o modelo incluiu tratamento experimental, tempo de incubação, animal, período e tempo de tratamento × tempo.

Seguinte:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + A_k + P_l + (TB)_{ij} + e_{ijkl}$$

Onde Y_{ijkl} = observação do efeito do tratamento i no tempo de incubação J no período k ; μ = média geral; T_i = efeito do nível A (tratamento, $i = (1:2; 1:3; 1:4; P_p; P_m)$), B_j = efeito do nível B [tempo de incubação para a degradabilidade ($j = 1, \dots, 7$)]; A_k = efeito do animal ($k = 1, \dots, 4$), P_l = efeito de período (tempo, $l = 1, 2$); AB_{ij} = interação entre tratamento i (nível) e tempo j ; e e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação.

Os resultados foram interpretados estatisticamente por meio de análises de variância e regressão, adotando-se nível de 5% de probabilidade. Os modelos foram selecionados com base no coeficiente de determinação e na significância dos coeficientes de regressão, adotando-se nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o teste F. Todas as análises foram realizadas pelo pacote computacional SAS (2012).

3. Resultados

3.1. Degradabilidade *in situ*

Os valores médios obtidos para as frações (a, b, c), taxa de passagem, degradabilidade efetiva e potencial estão expostos na Tabela 1 para os valores da degradabilidade da matéria seca (MS) e o nitrogênio (N). Assim como também se encontram as equações para estimativa da degradabilidade no decorrer do tempo. As equações apresentaram um comportamento linear, com R² partindo de valores de 0,56 e 0,60 para MS e N respectivamente, demonstrando a representatividade da equação de regressão.

Tabela 1. Estimativas da fração solúvel inicial (a), fração insolúvel potencialmente degradável (b), fração indigerível (c), taxa de degradação (Kd), degradação efetiva (DE) e degradação potencial (DP) da matéria seca e do nitrogênio das U_{ME}'s.

U _{ME}	Gran.	a (%)	b (%)	c (%)	DP (%)	kd (%)	DE (%)	Y	R ²
Matéria seca (MS)									
1:2	P _p	0,35	41,44	58,21	41,79	65,91	37,25	0,6591*X - 1,2149	0,68
1:2	P _m	1,55	41,01	57,44	42,56	46,08	35,77	0,4608*X + 0,4396	0,60
1:3	P _p	0,38	35,58	64,04	35,96	49,33	30,66	0,4933*X + 0,0535	0,74
1:3	P _m	1,28	31,94	66,78	33,22	65,73	29,22	0,6573*X - 0,8136	0,75
1:4	P _p	0,51	33,17	66,32	33,68	68,06	29,35	0,6806*X - 0,9236	0,56
1:4	P _m	1,18	27,51	71,31	28,69	59,85	25,45	0,5985*X - 0,6729	0,89
Nitrogênio (N)									
1:2	P _p	5,57	93,95	0,49	99,51	137,93	94,17	1,3793*X - 5,8696	0,61
1:2	P _m	6,67	92,72	0,61	99,39	147,89	94,62	1,4789*X - 4,9176	0,84
1:3	P _p	1,97	97,32	0,71	99,29	122,99	93,16	1,2299*X - 5,0418	0,65
1:3	P _m	3,33	95,78	0,89	99,11	153,57	93,66	1,5356*X - 5,1856	0,75
1:4	P _p	1,60	97,13	1,27	98,73	109,44	92,10	1,0944*X - 4,1607	0,60
1:4	P _m	2,31	96,07	1,62	98,38	120,77	92,28	1,2076*X - 3,4067	0,80

U_{ME}: ureia microencapsulada; Gran: granulometria; Y: equação de regressão. P_p: partícula pequena; P_m: partícula maior

Não houve interação significativa (P<0,05) entre os fatores nível e granulometria (Tabela 2). Houve diferença significativa (P<0,05) na granulometria na fração “a” e frações “a” e “b” da matéria seca. Para os níveis estudados, houve diferença significativa (P<0,05) nas frações “b” e “c”, DE e DP e frações “a”, “b” e “c”, DE e DP do nitrogênio.

Tabela 2. Teste de Tukey aplicado para fração solúvel inicial (a), fração insolúvel potencialmente degradável (b), fração indigerível (c), taxa de degradação (Kd), degradação efetiva (DE) e degradação potencial (DP) da matéria seca e do nitrogênio das U_{ME}'s.

Variáveis independentes		Variáveis dependentes				
		Matéria Seca (MS)				
Níveis	a (%) ^{ns}	b (%)**	c (%)**	DP (%)**	kd (%) ^{ns}	DE (%)**
1:2	0,95	41,23 A	57,82 B	42,18 A	56	36,51 A
1:3	0,83	33,76 B	65,41 A	34,59 B	56	29,94 B
1:4	0,84	30,34 B	68,81 A	31,19 B	63,95	27,40 B
P	0,5783	0,0001	0,0002	0,0002	0,6438	0,0002
R ²	0,81	0,62	0,60	0,60	0,20	0,70
E.P.M.	0,09	1,45	1,50	1,50	8,41	1,01
Granulometria	a (%)**	b (%) ^{ns}	c (%) ^{ns}	DP (%) ^{ns}	kd (%) ^{ns}	DE (%) ^{ns}
P _p	0,41 B	36,73	62,86	37,15	66,63	32,42
P _m	1,33 A	33,49	65,18	34,82	50,67	30,15
P	<0,0001	0,0668	0,1959	0,1959	0,0571	0,0649
R ²	0,81	0,62	0,60	0,60	0,20	0,70
E.P.M.	0,07	1,18	1,23	1,23	6,87	0,82
		Nitrogênio (N)				
Níveis	a (%)**	b (%)**	c (%)**	DP (%)**	kd (%) ^{ns}	DE (%)*
1:2	6,12 A	93,33 B	0,55 B	99,45A	142,91	94,39A
1:3	2,65 B	96,55 A	0,80 B	99,20A	138,28	93,41AB
1:4	1,95 B	96,60 A	1,45 A	98,55B	115,1	92,19B
P	<0,0001	0,0001	0,0016	0,0016	0,2163	0,0169
R ²	0,75	0,65	0,49	0,49	0,20	0,34
E.P.M.	0,43	0,47	0,15	0,15	11,58	0,49
Granulometria	a (%)*	b (%)**	c (%) ^{ns}	DP (%) ^{ns}	kd (%) ^{ns}	DE (%) ^{ns}
P _p	3,04 B	96,13 A	0,83	99,18	140,74	93,14
P _m	4,10 A	94,86 B	1,04	98,96	123,45	93,52
P	0,0448	0,0282	0,2353	0,2361	0,2108	0,5158
R ²	0,75	0,65	0,49	0,49	0,20	0,34
E.P.M.	0,35	0,38	0,13	0,13	9,46	0,40

Médias seguidas de letras iguais, não diferem ao teste de Tukey com 5% de probabilidade; * significância com $p \leq 5\%$; ** significância com $p \leq 1\%$; ^{ns} não significativo E.P.M.: Erro padrão da média. **P_p**: partícula pequena; **P_m**: partícula maior

O aumento da inclusão de cera no sistema microencapsulado acarretou uma redução na degradação efetiva e potencial, independente do tamanho de partícula tanto

para matéria seca quanto para o nitrogênio, demonstrando a eficiência da cera de carnaúba em regular a liberação de ureia.

Quanto ao aproveitamento do N, identifica-se que a DE e a DP não diferiram significativamente ($P > 0,05$) entre as U_{ME2} e U_{ME3} , onde a U_{ME2} teve uma DP 0,9% e DE 2,2% maior que a U_{ME4} , enquanto a U_{ME3} apresentou uma DP 0,5 e DE 1,22% maior que a U_{ME4} . Contudo, a formulação 4:1 não diferiu da 3:1, sendo então a formulação 2:1 que obteve maior êxito na utilização do conteúdo nitrogenado.

Ao avaliar a perda de massa na fração “a” nas diferentes granulometrias, observou-se que a P_m perdeu 235% a mais que a P_p (Tabela 2). Contudo, quando avaliada a perda de N na fração “a” dos diferentes tamanhos de partículas, constatou-se que a P_m liberou apenas 35% a mais nitrogênio que a P_p , demonstrando que a P_p , proporcionalmente possui o núcleo mais exposto, visto que necessitou perder menos matéria seca 0,41% para liberar mais nitrogênio 3,04%, contra 1,33% de matéria seca para liberar 4,10% de nitrogênio na P_m , conferindo também uma fragilidade ao sistema de P_p , visto que há uma maior exposição do núcleo das micropartículas e conseqüentemente serão mais facilmente atacados pela microbiota ruminal.

3.2 Perfil de liberação do nitrogênio

A liberação do nitrogênio transcorreu de maneira diferente entre os tamanhos de partículas estudados. Onde nas P_p houve uma liberação de 5,57; 1,97 e 1,6% no tempo zero e de 6,67; 3,33 e 2,31% no tempo zero das P_m para as U_{ME2} , U_{ME3} e U_{ME4} respectivamente.

A maior diferença no comportamento da liberação (Figura 1) tem início a partir dos primeiros 15 min de digestão, onde se observa uma redução do nitrogênio liberado acima de 50% nas P_m e mantendo uma saída mais gradual do nitrogênio de dentro da matriz lipídica.

Verifica-se que a U_{ME2} , apesar de ter liberado mais nitrogênio no tempo zero, foi a que melhor regulou a saída do nitrogênio em ambas as granulometrias (P_p e P_m) propiciando um maior aproveitamento do núcleo, desprendendo mais que 99,38% do N ao final de 6 h, independente do tamanho da partícula.

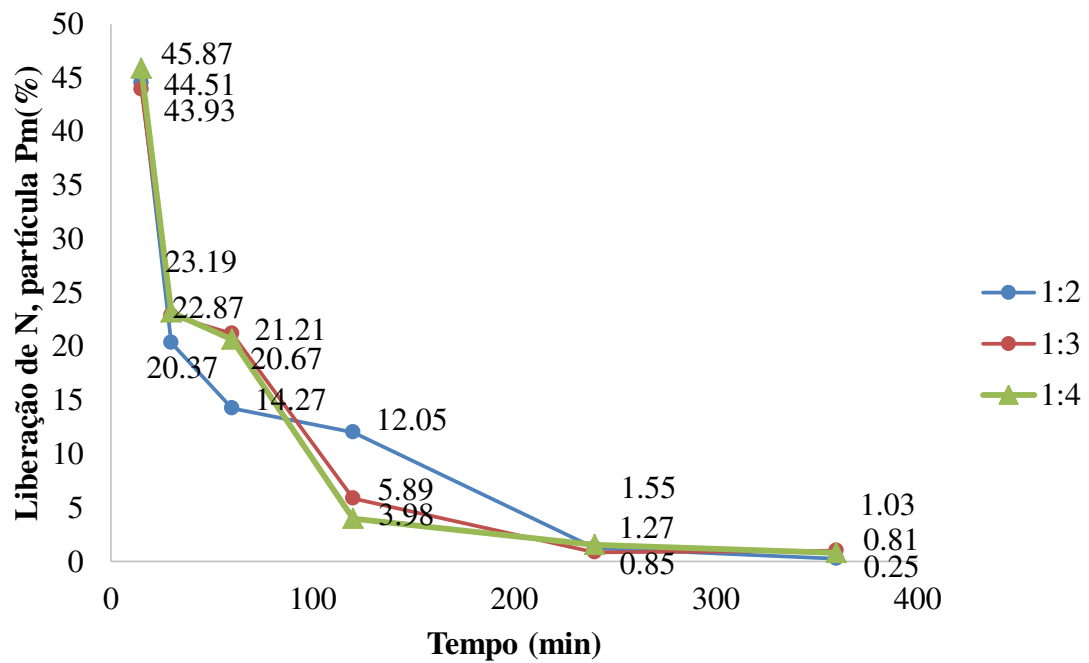
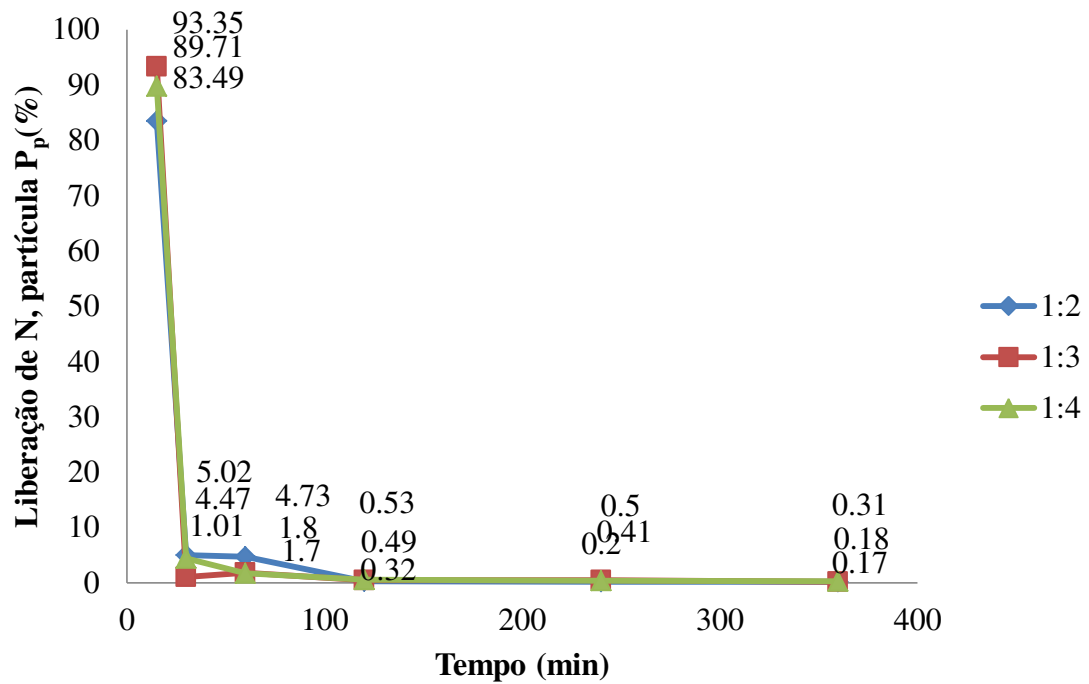


Figura 1. Perfis de liberação do Nitrogênio das U_{ME}'s 1:2; 1:3 e 1:4, para os dois tamanhos de partículas estudados.

3.3 Mecanismo de liberação do núcleo

Devido à semelhança na microestrutura, independente das formulações estudadas, para as micrografias obtidas antes e após a digestão, foram escolhidas as que melhor representaram o sistema e obtiveram melhor nitidez.

Avaliando as micrografias pode-se constatar que antes da digestão (a) a superfície da U_{ME} apresenta-se irregular, porém íntegra, selada, sem porosidade, o que não é mais visto na segunda micrografia (b), obtida a partir do material do último intervalo de tempo do teste *in situ*, onde a superfície apresenta sinais de erosão, algumas vacâncias e consequente perda de integridade.

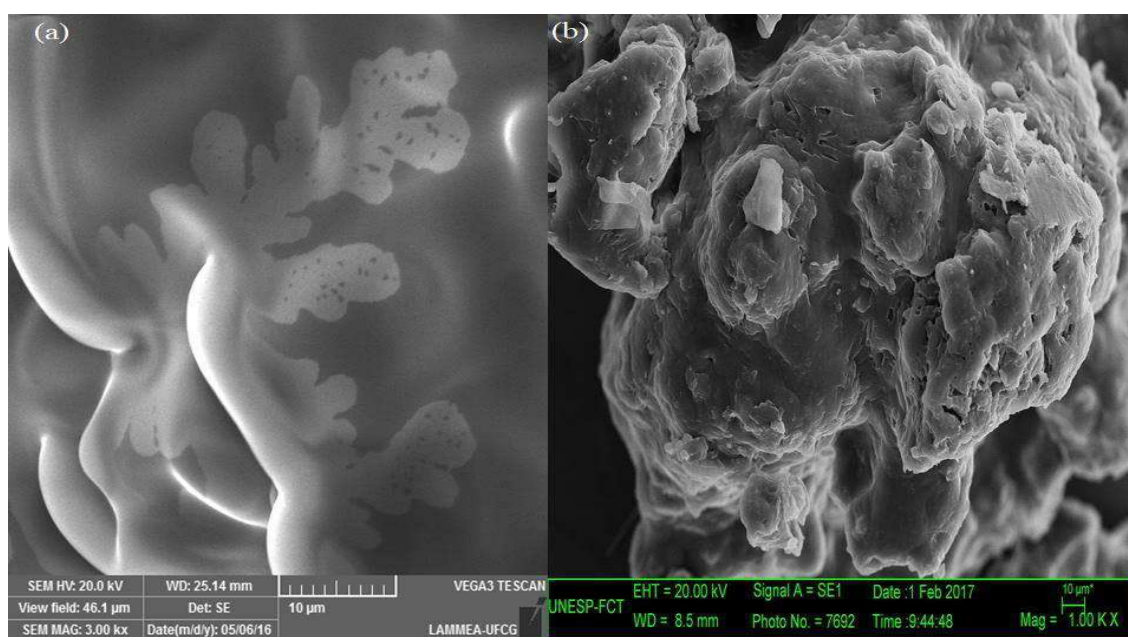


Figura 2. Micrografias da U_{ME} , obtidas antes (a) e após (b) o processo de digestão.

4 Discussão

4.1 Degradabilidade *in situ*

A redução das degradações efetiva e potencial, à medida que se aumentou os níveis de cera no sistema, apresentou uma redução no aproveitamento do núcleo para produção de proteína microbiana, o que é justificado pela maior quantidade de ureia

residual após o período de digestão, podendo configurar perdas visto que a ureia poderá não ser disponibilizada no rúmen para ser convertida pelas bactérias ureolíticas em amônia, seguindo intacta no trato gastro intestinal.

As frações “b” e “c” tanto para a matéria seca quanto para o nitrogênio, quando levados em consideração os níveis de cera, apresentaram na fração “b” uma redução com o aumento da inclusão da cera de carnaúba e conseqüentemente um aumento na fração “c”, este aumento pode caracterizar um fator possivelmente indesejável, pois aumentará a quantidade de nitrogênio que passará pelo rúmen sem ser aproveitado pela microbiota, caracterizando perdas.

A ureia remanescente na fração “c”, que seguirá pelo trato gastrointestinal, por conter uma quantidade mínima de ureia, ainda que seja liberada no abomaso ou intestinos, provavelmente não acarretariam problemas de saúde ao animal e quando excretada via fezes os problemas ambientais serão mínimos devido à proteção conferida pela cera de carnaúba. Além disto, os resíduos nitrogenados excretados nas fezes podem melhorar o aproveitamento do nitrogênio no ciclo natural no solo, graças a sua liberação gradativa, sendo objeto de muitas pesquisas na área agrícola para liberação lenta.

4.2. Perfil de liberação de Nitrogênio

Confrontando os perfis de liberação dos diferentes tamanhos de partículas estudados, observou-se que o aumento no tamanho da partícula conferiu ao núcleo das U_{ME} 's uma maior resistência ao ataque microbiano, possibilitando um retardo na degradação e conseqüentemente uma liberação mais sustentada.

Diferentemente do esperado, o aumento do nível da camada lipídica da parede não apresentou resultados proporcionais de melhoramento na proteção do núcleo, pois como observado na Figura 1 a U_{ME2} foi a que apresentou uma menor taxa de liberação.

O comportamento exposto na Figura 1, para as U_{ME} 's à base de cera de carnaúba sugere que a tal matriz lipídica possui capacidade de proteger a ureia, porém esse poder de proteção é limitado pelo tamanho da partícula e não é aumentado com o acréscimo de cera.

Ao mensurar a concentração de $N-NH_3$ no rúmen de novilhos, recebendo dietas com ureia de liberação lenta, Ribeiro et al. (2011) obtiveram um pico na concentração

de nitrogênio amoniacal no rúmen na primeira hora após alimentação, seguida por uma leve queda na concentração e após um período de 4 h da alimentação houve um novo pico, seguido por um declive dos valores de amônia, estabilizando-se 9 h pós alimentação.

Ao estudarem a inclusão de ureia polímero, Paula et al. (2009) observaram o maior pico de concentração de N-NH₃ no rúmen dentro das primeiras 2 h de digestão e mantendo-se elevado quando comparado ao tratamento controle, onde não havia fontes nitrogenadas solúveis, até 9 h após o início da digestão.

Azevedo et al. (2010) trabalhando com duas formulações de ureia protegida, onde o encapsulante utilizado foi resina de eucalipto, minerais e flor de enxofre ou caulim que estes últimos diferiram entre as formulações, encontraram uma liberação controlada onde o máximo foi obtido nas primeiras 2 h e com concentrações elevadas apenas nas primeiras 4 h de digestão. Chegeni et al. (2013) encontraram pico de liberação de nitrogênio passadas 3 h do início da digestão, com estabilização 9 h após incubação no rúmen.

Quando confrontado com os trabalhos expostos anteriormente, vê-se que a liberação para as ureias de liberação lenta (ULL), citadas são mais controladas, o que pode ser atribuído à forma de preparo, o material escolhido e principalmente à granulometria, já que nos trabalhos de Ribeiro et al. (2011), Paula et al. (2009) e Chegeni et al. (2013) foram utilizadas a ureia revestida por polímero (Optigen), que é obtida pelo revestimento polimérico dos grânulos de ureia, contribuindo para um maior tamanho de partícula. Já a ULL utilizada por Azevedo et al. (2010), que também era encapsulada, porém não é caracterizado seu tamanho, houve um controle menor, por até 4 h, o que leva a crer que o encapsulado obtido para teste poderia ser menor que a Optigen, que é ureia revestida, como já mencionado.

A liberação do nitrogênio para os diferentes tamanhos de partícula pode ser atribuído a uma maior facilidade de exposição da totalidade dos núcleos de cada micropartícula, contribuindo para acelerar o crescimento e adesão bacteriana específica (ureolíticas), somado a isto, o aumento dos patamares de amônia ruminal pode ter favorecido um aumento taxa de passagem dos alimentos, o que de acordo com Santos e Pedroso. (2011) melhora a eficiência microbiana por garantir uma renovação constante

da microbiota aumentando a quantidade de bactérias jovens com maior poder de fermentação.

4.3. Mecanismo de liberação do núcleo

Com base nos aspectos das superfícies da U_{ME} , pode-se pressupor que os principais mecanismos de liberação envolvidos nesse material foram a biodegradação (erosão) e a difusão. Assim como descrito por Lopes et al. (2005), onde os principais mecanismos de controle da liberação das substâncias ativas (encapsulado) por matrizes lipídicas são a erosão e a difusão, havendo uma prevalência de um dos mecanismos. Em que para o material produzido neste estudo, houve uma prevalência da difusão, visto que o nitrogênio desapareceu em maior proporção que a cera foi degradada pela microbiota ruminal.

5. Conclusões

A cera de carnaúba propiciou uma maior biodisponibilidade da ureia, reduzindo o risco de intoxicação. A diminuição do potencial no uso da ureia pode ser explicada pelos mecanismos de liberação, visto que além da difusão, fez-se necessário a degradação da cera, fato que impediu o aproveitamento do N, mas não diminuiu a taxa de liberação. O comportamento das granulometrias estudadas demonstrou que o aumento do tamanho da partícula tende a regular melhor a taxa de liberação do N, sendo mais eficaz que acrescentar cera ao sistema. Desta forma conclui-se que a cera de carnaúba é uma alternativa promissora para liberação gradual de ureia. Recomendando-se a proporção 1:2.

6. Referências

AOAC, **Association of Analytical Chemists. Official Methods of Analysis.** 14th Edition Washington DC, 2012.

AZEVEDO, E. B.; PATIÑO, H. O.; SILVEIRA, A. L. F.; LÓPEZ, J.; BRÜNING, G.; KOZLOSKI, G. V. Incorporação de ureia encapsulada em suplementos proteicos fornecidos para novilhos alimentados com feno de baixa qualidade. **Ciência Rural**, v.38, n.5, p.1381-1387, 2008.

BARTLEY, E.E.; DEYOE, C. W. Starea as a protein replacer for ruminants. A review of 10 years of research. **Feedstuffs**, v.47, p.42-44, 1975.

CASS, J. L.; RICHARDSON, C. R. In vitro ammonia release from urea/calcium compounds as compared to urea and cottonseed meal. **National Research Technology Report**. T-5-342, Texas Tech University, 1994.

CASTAÑEDA-SERRANO, R.D.; FERRIANI-BRANCO, A.; TEIXEIRA, S.; GARCIA-DIAZ, T.; DIEGO-SOFIATI, A. Slow release urea in beef cattle diets: digestibility microbial synthesis and rumen kinetic. **Agrociencia**. v.47, p.13-24, 2013.

CHEGENI, A.; LI, Y.L.; DENG, K.D.; JIANG, C.G.; DIAO, Q.Y. Effect of dietary polymer-coated urea and sodium bentonite on digestibility, rumen fermentation, and microbial protein yield in sheep fed high levels of corn stalk. **Livestock Science**, v.157 p.141–150, 2013.

FORERO, O.; OWENS, F. N.; LUSBY, K. S. Evaluation of slow-release urea for winter supplementation of lactating range cows. **Journal of Animal Science**, v.50, p.532-538, 2001.

GALO, E., S. M. EMANUELE, C. J. SNIFFEN, J. H. WHITE AND J. R. KNAPP. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v.86, p.2154-2162, 2003.

HUNTINGTON, G.B.; HARMON, D.L.; KRISTENSEN, N.B.; HANSON, K.C.; SPEARS, J.W. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and

endogenous production of urea by cattle. **Animal Feed Science and Technology**. v.130, p.225-241, 2006.

LÖEST, C. A.; TITGEMEYER, C. E.; LAMBERT, B. D.; TRATER, A. M. Branched-chain aminoacids for growing cattle limited-fed soybean hull-based diets. **Journal of Animal Science**. v.79, p.2747-2753, 2001.

LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.41, n.2, p.143-154, 2005.

MEHREZ, A.Z., ØRSKOV, E.R. A study of the artificial bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen. **Journal of Agriculture Science**, v.88, n.3, p.645-650, 1977

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal digestion and energy digestibility: A review. **Journal of Dairy Science**, v.7, n.8, p.2051-2069, 1988.

ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v.92, p. 449-453, 1979.

PAULA ,A.A.G.; FERREIRA, R.N.; ORSINE, G.F.; GUIMARÃES, L.O.; OLIVEIRA,E.R. Ureia polímero e ureia pecuária como fontes de nitrogênio sóluvel no rúmen: parâmetros ruminal e plasmático. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2009.

PEZZINI, B.R.; SILVA, M.A.S.; FERRAZ, H.G. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.43, n.4, p.491-502, out./dez., 2007.

PROKOP, M. J.; KLOPFENSTEIN, T. J. **Slow ammonia release urea**. Nebraska Beef Cattle Report. EC 77-218, 1997.

RIBEIRO, S.S.; VASCONCELOS, J.T.; MORAIS, M.G.; ÍTAVO, C.B.C.F.; FRANCO, G.L. Effects of ruminal infusion of a slow-release polymer-coated urea or conventional urea on apparent nutrient digestibility, in situ degradability, and rumen parameters in cattle fed low-quality hay. **Animal Feed Science and Technology** v.164, p.53–56, 2011.

RODRIGUES, D.C.; CACERES, C.A.,RIBEIRO, H.L.; ABREU, R.F.A.; CUNHA .A.P.; AZEREDO, H.M.C. Influence of cassava starch and carnauba wax on physical properties of cashew tree gum-based films. **Food Hydrocolloids**. v.38, p.147-151, 2014

SANTOS, F.A.P.; PEDROSO, A.M. Metabolismo de proteínas. p.265-297. In: **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal. FUNEP. P.616, 2011.

Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., **SAS User's Guide**, Cary, USA: SAS Institute, 2012

VARELA, M.C.; CARVALHO, R.G. Viabilidade ambiental para a criação de unidades de conservação na Ilha da Coroa, Mossoró – RN. **Sociedade & Natureza**, Uberlândia, v.21, n.2, p.7-21, ago. 2009.