



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**MICROESFERAS LIPÍDICAS DE CERA DE ABELHA E CARNAÚBA  
CONTENDO UREIA ENRIQUECIDAS COM FONTE DE ENXOFRE PARA  
LIBERAÇÃO GRADUAL NA DIETA DE RUMINANTES**

**ANA CÉLIA CORDEIRO DA SILVA**

**PATOS-PB**

**2021**

**ANA CÉLIA CORDEIRO DA SILVA**

**MICROESFERAS LIPÍDICAS DE CERAS ABELHA E CARNAÚBA  
CONTENDO UREIA ENRIQUECIDAS COM FONTE DE ENXOFRE PARA  
LIBERAÇÃO GRADUAL NA DIETA DE RUMINANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, área de concentração: Produção e Sanidade animal, área de atuação: Avaliação de alimentos e Nutrição animal.

**Orientador:** Prof. Dr. André Leandro da Silva

**PATOS-PB**

**202**

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

- S586m Silva, Ana Célia Cordeiro da.  
Microesferas lipídicas de ceras abelha e carnaúba contendo ureia enriquecidas com fonte de enxofre para liberação gradual na dieta de ruminantes / Ana Célia Cordeiro da Silva. – Patos, 2021.  
67 f.
- Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde Animal) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2021. "Orientação: Prof. Dr. André Leandro da Silva".  
Referências.
1. Saúde Animal. 2. Nutrição Animal. 3. Lipídio. 4. Avaliação de Alimentos. 5. NNP. 6. Microencapsulação. I. Silva, André Leandro da. II. Título.
- CDU 614.9(043)



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

**PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

**TÍTULO:** “Microesferas lipídicas de ceras abelha e carnaúba contendo ureia enriquecidas com fonte de enxofre para liberação gradual na dieta de ruminantes”

**AUTORA:** ANA CÉLIA CORDEIRO DA SILVA

**ORIENTADOR:** Dr. ANDRÉ LEANDRO DA SILVA

**JULGAMENTO**

**CONCEITO:** APROVADO

Dr. André Leandro da Silva  
UAMV-UFCG  
Presidente

Dra. Rosine Agra da Silva  
1º Examinadora

Dr. José Morais Pereira Filho  
UAMV-UFCG  
2º Examinador

Patos - PB, 31 de agosto de 2021

  
Dr. José Fábio Paulino de Moura  
Coordenador  
Prof. Dr. José Fábio Paulino de Moura  
Coordenador PPGCA/CSTR/UFCG  
Mat. SIAPE1506999

## **DEDICATÓRIA**

A minha filha em especial, os meus pais, Sebastião Cordeiro e Ana Maria Sindor da Silva, e as minhas irmãs Luciana e Ana Lucia, pelo possível e impossível que fizeram por mim para que alcançasse este objetivo.

Consagra ao Senhor tudo o  
que você faz, e os seus  
planos serão bem  
sucedidos.

Provérbios 16:3

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, pela minha vida e por tudo que tenho e que sou, por me capacitar, a cada dia, na busca de meus objetivos, me concedendo sabedoria, perseverança.

Obrigado por me permitir errar, aprender e crescer, por sua eterna compreensão e tolerância, por seu infinito amor, pela sua voz “invisível” que não me permitiu desistir. Diante da realização de um sonho, vivi momentos de pura alegria e aflição, Deus me concedia a graça de ser mãe e de conhecer o verdadeiro significado do amor, ao mesmo tempo a responsabilidade de enfrentar o meu tão sonhado mestrado. Deus é implacável, me capacita até hoje para se dedicar aos meus estudos e cuidar da minha amada filha Anna Lys, que esteve comigo desde o meu ventre e no decorrer da minha trajetória, são lembranças que jamais irei esquecer, as incansáveis noites no laboratório, semanas de coleta na fazenda, há minha filha foi e é a minha força para que tudo se tornasse possível. Agradeço aos meus pais *Ana Maria, Sebastião* por acreditar no meu sucesso e por ter impulsionado com suas palavras simples e carregadas de energia que tudo iria dá certo, gratidão pelo amor e cuidado para comigo e minha filha. As minhas irmãs *Ana Lúcia e Luciana* pela lealdade de irmandade, por cada oração e prontidão em me ajudar nas horas de alegria e tristeza. Aos meus sobrinhos *Moisés e Matheus* por alegrarem minha vida com sua doçura.

A minha prima *Marceliana*, pela disponibilidade e cuidado com minha filha, gratidão por sua amizade. Aos meus amigos, *Raimundo, Wydiane, Toinzinho, Hiago*

Aos meus colegas do curso de pós-graduação em ciência animal pela amizade, troca de conhecimentos e experiências. *Fabricio, Thiago, Angélica, Myrla, Karina, Eriton, Sheila, Layse,kevily.*

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa durante todo o período de realização deste mestrado.

Ao meu orientador, *Prof. Dr. André Leandro da Silva*, pela oportunidade de pesquisa, por todo conhecimento e toda atenção cedida, pela paciência e empatia ao próximo, gratidão por cada áudio de incentivo, obrigada por confiar e acreditar nos seus orientandos, nós que fazemos parte do seu grupo de pesquisa somos lisonjeados.

Aos professores e servidores da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG/CSTR, pelos ensinamentos adquiridos.

A todos os meus sinceros agradecimentos! Em especial, ao *Prof. Dr. José Morais Filho, Prof. Dr. Leilson Rocha Bezerra e Prof. Antônio Fernando de Melo Vaz, Juliana Paula Felipe de Oliveira.*

A Universidade Federal Ministro Petrônio Portella, Teresina, Piauí. Pela disponibilidade nas realizações de análises.

Ao Secretário da Pós-graduação em Ciência Animal, *Ary Cruz Guedes* por todo apoio aos alunos.

A *Otávio* do Laboratório de Nutrição animal pelos ensinamentos, paciência e amizade.

Aos *funcionários* da Fazenda experimental, que contribuíram direta ou indiretamente durante a execução do experimento.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE SIGLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMO GERAL</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>CAPÍTULO I Microesferas lipídicas contendo ureia por liofilização e emulsificação</b>	<b>18</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
2.1. Desenvolvimento de ureia microencapsulada e morfologia dos sistemas.....	23
2.2. Rendimento e eficiência da microencapsulação .....	24
2.3 Termogravimetria (TG) e Colorimetria exploratória diferencial (DSC).....	25
2.4 Análise de nitrogênio nos sistemas microencapsulados.....	25
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>43</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO II Avaliação in situ, frente aos parâmetros ruminais e metabólicos de ovinos recebendo dieta à base de microesferas contendo ureia</b> .....	<b>34</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
2.1. Local do experimento .....	38
2.2. Teste <i>in situ</i> .....	39
2.3. Parâmetros ruminais.....	42
2.4. Parâmetros sanguíneos .....	43
2.5. Delineamento experimental e análise estatística.....	43
2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	54
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>4. CONCLUSÃO</b> .....	<b>59</b>
<b>5. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>
<b>6. ANEXOS</b> .....	<b>64</b>

**LISTA DE SIGLAS**

ALB	Albumina
AW	Atividade de água
AST	Aspartato aminotransferase
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
Ca	Cálcio
CAUS	Cera de abelha ureia e enxofre
CAU	Cera de abelha e ureia
CCUS	Cera de carnaúba ureia e enxofre
CCU	Cera de carnaúba e ureia
cm	Centrímetro
°C	Grau Celsius
COL	Colesterol
CRE	Creatinina
CEUA	Comitê de Ética em Experimentos com animais
dL	Decilitro
DTG	Termogravimetria derivada
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DE	Degradação efetiva
DP	Degradação potencial
EM	Eficiência de microencapsulação
F	Fator de correção do ácido clorídrico
g	Grama
g/m <sup>2</sup>	Grama por miligrama
g/L	Grama por litro
h	Hora
kd	Taxa de passagem
kg	Quilograma
m/v	Massa de soluto pelo volume da solução
mg	Miligrama
mmol/L	Milimol por litro
mL/min	Mililitro por minuto
mg/dL	Miligrama por decilitro
M	Molaridade
MS	Matéria seca
NNP	Nitrogênio não proteico
np	Número de protozoários
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio amoniacal
N	Nitrogênio
NRC	National Research Council
PB	Proteína bruta
pH	Potencial hidrogeniônico
PT	Proteína total
RM	Rendimento de microencapsulação
rpm	Rotação por minuto

SRU	Ureia de liberação lenta
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão de patrimônio e conhecimento Tradicional Associado
Tosent	Temperatura inicial de degradação
TG	Termogravimetria
TNT	Tecido não tecido
TRI	Triglicerídeo
TUS	Teor de ureia no soro
U/L	Unidade de massa atômica por litro de sangue
UFMG	Universidade Federal de Campina Grande
Ureal	Teor real de ureia retido
Uteórica	Teor de ureia inserido
V	Volume do ácido clorídrico gasto na titulação
$\mu\text{L}$	Micrograma
$\mu\text{Mol}$	Micromol

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E GRÁFICOS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 1.</b> Rendimento das microferas contendo ureia 2:1 .....	26
<b>Tabela 1.</b> Média e desvio padrão (DP) ara a quantificação do nitrogênio (N) total, teor de proteína bruta, teor teórico de ureia, teor real de ureia e eficiência da encapsulação.....	27
<b>Figura 2.</b> Curvas termogravimétricas (TG) da ureia (U), cera de abelha (CA) e cera de carnaúba (CC), formulações 2.1.....	28
<b>Figura 3.</b> Calometria exploratória (DSC).....	29

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Composição química dos ingredientes das dietas experimentais utilizadas na alimentação dos ovinos.....	42
<b>Tabela 2.</b> Proporção dos ingredientes e composição química da dieta.....	42
<b>Figura 1.</b> Comportamento do pH ruminal de ovinos alimentados com ureia microencapsuladaCinética .....	45
<b>Figura 2.</b> Comportamento da temperatura ruminal de ovinos alimentados com ureia microencapsulada. ....	46
<b>Figura 3.</b> . Contagem de Protozoários (1mL) do fluido ruminal de ovinos usando microesferas lipídicas contendo ureia.....	47
<b>Tabela 3.</b> Aspectos físicos do fluido ruminal de ovinos confinados submetidos a dieta com microencapsulados lipídicos contendo ureia para obtenção de liberação lenta.....	48
<b>Tabela 4.</b> Estimativa da densidade de protozoários observados durante as coletas do liquido ruminal. ....	50
<b>Tabela 5.</b> Avaliação do fluido ruminal de ovinos, quanto aos percentuais de vivos e motilidade frente ao tempo de incubação .....	52
<b>Figura 4.</b> Valores de Albumina (g/L) usando microesferas lipídicas contendo na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação .....	53

<b>Figura 5.</b> Valores de Creatinina (mg/dL) usando fontes lipídicas contendo ureia enriquecidas com enxofre na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tempo e tratamento de incubação .....	54
<b>Figura 6.</b> Valores de Proteína Total (mg/dL) usando fontes lipídicas contendo ureia enriquecidas com enxofre na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tempo e tratamento de incubação .....	55
<b>Figura 7.</b> Valores de ureia sanguínea (mg/dL) usando fontes lipídicas contendo ureia enriquecidas com enxofre na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação aos tempos de coleta e tratamentos de incubação .....	56
<b>Figura 8.</b> Concentrações séricas de AST (U/L), usando fontes lipídicas contendo ureia enriquecidas com enxofre na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação aos tempos de coleta .....	57
<b>Figura 9.</b> Concentrações séricas de Colesterol(mg/dL) em relação ao tempo e tratamento de incubação .....	57
<b>Figura 10.</b> Concentrações séricas de e triglicerídeos (mg/dL) em relação ao tratamento e ao tempo de incubação .....	58
<b>Figura 11.</b> Micrografias de varredura (MEV) referentes ao material após a incubação de 48h CAUS, CAU, CCUS e CCU.....	59

## RESUMO GERAL

A ureia constitui-se como uma das alternativas na redução de custos e por sua aplicabilidade na alimentação. Objetivou-se obter sistemas microencapsulados com encapsulantes lipídicos naturais contendo ureia com e sem enxofre pela técnica de emulsificação/liofilização, incluindo quatro sistemas na proporção fixa de 2:1(Cera: Ureia), sendo eles: CAUS (Cera de abelha:ureia:enxofre), CCUS (Cera de carnaúba:ureia:enxofre), CAU (Cera de abelha: ureia), CCU (Cera de carnaúba: ureia). Para os sistemas enriquecidos com enxofre (Sulfato de magnésio heptahidratado), a proporção da fonte de nitrogênio e enxofre foi de 10:1, respectivamente. Todos os sistemas microencapsulados foram caracterizados quanto a rendimento de microencapsulação (RM), teor de ureia retido (capacidade de carga), eficiência da microencapsulação (EM) e por técnicas de termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e atividade de água (Aw). Avaliou-se também as micropartículas *in situ* frente aos parâmetros ruminais e sanguíneos, utilizando dois ovinos fistulados no rúmen, machos, da raça Santa Inês com peso médio de  $48,9 \pm 5,2$  kg e idade 2 anos. As formulações CAUS, CCUS, CAU, e CCU apresentaram eficiência de microencapsulação de, respectivamente,  $97,15 \pm 9,28$ ;  $75,65 \pm 2,44$ ;  $98,29 \pm 2,15$  e  $94,46\% \pm 1,8$ . As curvas TG e de DSC mostraram que a presença da fonte de S diminui a proteção da ureia para ambas as ceras, assim como a cera de abelha como encapsulante proporciona maior estabilidade térmica para ureia. CCU propiciou a maior média com pH entre os valores de referência da neutralidade (6,45), favorecendo a elevação significativa na densidade populacional de protozoários do rúmen, expressando sua significância de maior média em 14,97 protozoários ( $10^6/\text{mL}$ ). A formulação CAUS promoveu maior densidade e motilidade de protozoários entre as categorias grandes, médios e pequenos, apresentando os respectivos valores de 6,0; 6,88 e 7,5 min. A microestrutura para o último tempo de incubação (48 h) foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sugerindo ocorrência de biodegradação, a qual aumenta com a inclusão da fonte de enxofre para ambos os cerídeos estudados.

**Palavras-chave:** microencapsulação, NNP, lipídio.

## GENERAL ABSTRACT

Urea is one of the alternatives in cost reduction and because of its applicability in food. The objective was to obtain microencapsulated systems with natural lipid encapsulants containing urea with and without sulfur by the emulsification/lyophilization technique, including four systems at a fixed ratio of 2:1 (Wax:Urea), namely: CAUS (Beeswax: urea: sulfur), CCUS (Wax of carnauba: urea: sulfur), CCA (Beeswax: urea), CCU (Carnauba wax: urea). For systems enriched with sulfur (magnesium sulfate heptahydrate), whose nitrogen and sulfur source ratio was 10:1, respectively. All microencapsulated systems were characterized regarding microencapsulation yield (RM), retained urea content (loading capacity), microencapsulation efficiency (EM) and thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC) techniques and water activity (Aw). The microparticles in situ were also histories against the ruminal and blood parameters, using two rumen fistulated sheep, male Santa Inês breed with an average weight of  $48.9 \pm 5.2$  kg and aged 2 years. The formulations CAUS, CCUS, CAU, and CCU microencapsulation dissipation  $97.15 \pm 9.28$ ,  $75.65 \pm 2.44$ ,  $98.29 \pm 2.15$ ,  $94.46\% \pm 1.8$  respectively. The DSC and TG curves showed that the presence of the S source decreases the effectiveness of urea protection, the beeswax lipid microparticles as an encapsulant have greater thermal stability, which is related to a better protection of the core in relation to temperature, enabling the intended gradual release. The of the microparticles for the last incubation time (48 h) was investigated by scanning electron microscopy (SEM) in which the presence of the sulfur source decreased, even if slightly, the thermal stability of the microparticles for both cerids studied. The CCU system established the highest mean with pH among the neutrality reference values of 6.45, this system favored the significant increase in the population density of rumen protozoa expressing its significance of the highest mean of 14.97 protozoa ( $10^6/\text{mL}$ ). The CAUS formulation promoted greater protozoan density and motility among the categories, presenting the respective values of 6.0, 6.88 and 7.5 min. The microstructure for the last incubation time (48 h) was investigated by scanning electron microscopy (SEM), suggesting the

occurrence of biodegradation, which increases with the inclusion of the sulfur source for both cerids studied.

Keywords: microencapsulation, NNP, lipids.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização do nitrogênio não proteico na suplementação dos ruminantes é uma prática bastante disseminada entre os produtores, por sua vasta potencialidade na produção de proteína de origem animal, especialmente nas épocas adversas ao desenvolvimento de forragens de qualidade.

A ureia constitui-se como uma das alternativas na redução de custos e por sua aplicabilidade na alimentação. Apresenta na sua composição 45% de N, como também um equivalente de 281% de proteína bruta, pela qual é inteiramente degradável no rúmen (MACIEL, 2017).

A proteína é um dos nutrientes que mais onera nos gastos nas propriedades rurais. Nesse sentido, a ureia é implementada na dieta de ruminantes como fonte de nitrogênio não proteico (NNP) em substituição parcial às fontes de proteína verdadeira, fornecendo quantidades equivalentes de proteína degradável no rúmen, capazes de estimular a eficiência da digestão de fibras e melhorar a síntese de proteína microbiana.

Um dos entraves dessa suplementação é o risco com intoxicação, em virtude da alta capacidade de hidrólise no rúmen, quando a ureia entra em contato com ambiente ruminal é rapidamente fragmentada em amônia e dióxido de carbono, sobre a ação da enzima urease.

Assim, acarreta uma absorção e migração para as células, o que impossibilita o ciclo de Krebs. Diante disso, há um aumento nos níveis de glicose anaeróbica, o que por sua vez, desencadeia um quadro de acidose metabólica e hipercalemia terminal (SANTANA NETO et al., 2014).

Essa intercorrência advém no momento em que a velocidade de degradação ruminal da proteína excede a velocidade de utilização dos compostos nitrogenados. Desta forma, toda a amônia oriunda a partir de NNP é o principal composto utilizado pelos microrganismos do rúmen, especificamente as bactérias fermentadoras de carboidratos, pela qual desempenha um papel fundamental na síntese de proteína microbiana (AZEVEDO et al., 2015).

Em consequência da rápida liberação da amônia fomenta um acúmulo de nitrogênio amoniacal no rúmen, o qual parte pode ser metabolizado pelo fígado e convertido em ureia, como também pode ser excretado via urina ou ser reciclado através da saliva e da parede ruminal (GONSALVES NETO et al., 2017).

Diante do exposto, é necessário averiguar novas metodologias que venham sanar tais problemáticas, por intermédio de alternativas que visem sincronizar a liberação da amônia e amplifique o tempo de sua disponibilidade no ambiente ruminal, como também reduza o risco de intoxicação. Sob esse viés, a tecnologia de microencapsulação, objetiva-se em proteger o núcleo em controlar a liberação no rúmen para o maior aproveitamento pelo animal (GALLO et al., 2015).

A tecnologia de microencapsulação já é bastante difundida no ramo alimentício, entretanto para área de ciências agrárias precisa ter melhor entendimento e exploração de seu potencial e vantagens.

Em síntese, a microencapsulação consiste em “revestir” o material ativo seja na forma líquida, sólida ou gasosa em pequenas cápsulas, por intermédio de uma ampla variedade de material de revestimento, podendo promover a integridade do valor nutricional dos ingredientes, possibilitando a sua liberação em locais específicos sem causar nocividades à saúde do animal (NEDOVICA et al., 2011; RAY et al., 2016; SILVA et al., 2014).

Entre a versatilidade de substâncias que podem ser aplicadas como material encapsulante, destaca-se as ceras de abelha e de carnaúba como produtos naturais, inertes à flora ruminal, e podendo atuar na redução da toxicidade e com biocompatibilidade para atuar como barreira física na sincronização gradual da ureia.

---

## CAPÍTULO I

---

### **Microesferas lipídicas contendo ureia obtidas por emulsificação/liofilização**

## Microesferas lipídicas contendo ureia obtidas por emulsificação/liofilização

### Resumo

A ureia é uma fonte de NNP bastante utilizada na nutrição animal. Objetivou-se desenvolver e investigar ureia microencapsulada em matrizes lipídicas naturais de cera de carnaúba e abelha com e sem enriquecimento com fonte de enxofre. Os sistemas foram desenvolvidos com proporção fixa de 2:1 (Cera: Ureia) e para os sistemas enriquecidos com enxofre (Sulfato de magnésio heptaidratado), a proporção da fonte de nitrogênio e enxofre foi de 10:1, respectivamente. As microesferas foram caracterizadas quanto ao rendimento de microencapsulação, teor de ureia retido (capacidade de carga), eficiência da microencapsulação e por técnicas de termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC). CAUS, CCUS, CAU, CCU apresentaram rendimento e 97,03; 107,34, 92,9 e 104,51%. A eficiência de microencapsulação de  $97,15 \pm 9,28$ ;  $75,65 \pm 2,44$ ;  $98,29 \pm 2,15$  e  $94,46\% \pm 1,85$ , respectivamente. De acordo com as curvas TG, U, CA e CC apresentaram temperatura inicial de degradação térmica ( $T_0$ ) em 147, 223 e 254 °C, respectivamente, enquanto CAU, CAUS, CCU e CCUS em 156, 151, 151 e 147 °C, respectivamente, sendo valores superiores em relação à U, já CCUS manteve o mesmo valor de U. As curvas de DSC mostraram que a ureia em CAU, CAUS, CCU e CCUS apresentou fusão em 146, 137, 135 e 132 °C, evidenciando, portanto, ambas as análises térmicas (TG e DTG), que a presença da fonte de S diminui a efetividade da proteção da ureia, assim como mostram que as micropartículas lipídicas utilizando cera de abelha como encapsulante possuem maior estabilidade térmica, o que se relaciona com uma melhor proteção do núcleo em relação à temperatura, proteção esta que pode se reproduzir no ambiente ruminal frente às condições lá existentes, através das microesferas lipídicas obtidas por emulsificação/liofilização o que se mostrou-se satisfatório quanto à técnica de microencapsulação escolhida, assim como em relação aos encapsulantes utilizados, possibilitando a liberação gradual pretendida.

**Palavras-chave:** liofilização, ureia microencapsulada, NNP protegido.

## Lipid microspheres containing urea obtained by emulsification/lyophilization

### Abstract

The objective was to develop and investigate microencapsulated urea in natural lipid matrices of carnauba and bee wax with and without enrichment with a sulfur source. The systems were developed with a fixed ratio of 2:1 (Wax:Urea) and for the systems enriched with sulfur (magnesium sulfate heptahydrate), the ratio of nitrogen and sulfur source was 10:1, respectively. The microspheres were characterized for microencapsulation yield, retained urea content (loading capacity), microencapsulation efficiency and by thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC) techniques. CAUS, CCUS, CAU, CCU presented yield and 97.03; 107.34, 92.9 and 104.51%. The microencapsulation efficiency of  $97.15\pm 9.28$ ;  $75.65\pm 2.44$ ;  $98.29\pm 2.15$  and  $94.46\%\pm 1.85$ , respectively. According to the TG, U, CA and CC curves, they presented initial thermal degradation temperature ( $T_0$ ) at 147, 223 and 254 °C, respectively, while CAU, CAUS, CCU and CCUS at 156, 151, 151 and 147 °C, respectively, presenting higher values compared to U, whereas CCUS maintained the same value as U. The DSC curves showed that urea in CAU, CAUS, CCU and CCUS melted at 146, 137, 135 and 132 °C, thus evidencing both thermal analyzes (TG and DTG), that the presence of the S source decreases the effectiveness of urea protection, as well as showing that lipid microparticles using beeswax as an encapsulant have greater thermal stability, which is related to better protection of the core in relation to temperature, protection that can be reproduced in the ruminal environment against the conditions existing there, enabling the intended gradual release.

**Keywords:** lyophilization, morphology, microencapsulated urea, protected NNP.

## 1. INTRODUÇÃO

A princípio, a microencapsulação é determinada como um conjunto de técnicas que visam produzir partículas, cercadas de um revestimento a uma matriz heterogênea ou até mesmo homogênea, e desta forma elaborar microcápsulas com tamanho de 1 a 1000 microns com propriedades de liberação controlada do seu material em tempo e destino almejados, efetivando assim a sua total proteção para substâncias que são susceptíveis à degradação ou redução da sua aplicabilidade devido a condições adversas, por exemplo, a oxidação e a hidrólise (Kuck,& Noreña, 2016, Ye, Georges, & Selomulya, 2018).

Primordialmente, a microencapsulação vem sendo explorada nos segmentos alimentício, cosmético e farmacêutico e tampouco explorada nas ciências agrárias, sendo as pesquisas voltadas a este seguimento, por conseguinte de cunho inovador e promissor para a nutrição animal, podendo sanar problemas recorrentes na alimentação de forma satisfatória e economicamente viável.

Logo, essa é uma área em crescente extensão que visa desenvolver técnicas que logrem uma melhor produção de produtos correlacionado com um alto valor nutricional bem como atender a exigências de bem-estar e saúde (BARRETO et al., 2015; SILVA et al., 2014).

Para se obter sucesso na execução do processo da microencapsulação, devem-se levar em consideração alguns requisitos, como o peso e a estrutura molecular, a ebulição e o ponto de fusão (estado físico), atividade microbiana (estrutura biológica), dissolubilidade e área de contato, estabilidade química e propriedades ópticas, além disso todos os materiais de revestimento devem portanto serem biocompatíveis, biodegradáveis, atóxicos e de baixos custos (Ye, Georges, & Selomulya, 2018;Matté, & Rosa, 2013 ).

Nesse contexto, os materiais devem apresentar propriedade emulsificante, com baixos valores de viscosidade, assim como boas propriedades de solubilidade. Certamente, essas escolhas vão auxiliar no direcionamento da liberação dos compostos bioativos, onde são capazes de atuar em locais específicos (Shishir et al., 2018).

Uma das mais antigas técnicas empregadas na microencapsulação é a emulsificação, sendo bastante solicitada quando um composto a ser encapsulado requer unir uma fase dispersa em uma fase contínua pela ação de um emulsificante ou tensoativo (NAZZARO et al., 2012).

Entre a versatilidade de técnicas usadas na microencapsulação destaca-se a liofilização em virtude da aplicação de baixas temperaturas, como também pelo seu desempenho em proporcionar a preservação do núcleo, ou seja, enclausurando os compostos em matrizes sólidas. De forma geral, é uma técnica que tem como base a desidratação de um produto congelado por sublimação, sendo conduzido, primeiramente, para o congelamento rápido do produto, logo em seguida da sublimação do gelo sob vácuo (Azeredo, 2005; García et al., 2015).

Notoriamente existe uma multiplicidade de materiais que podem ser empregados como encapsulante, cada um com suas particularidades, dentre elas, destaca-se a utilização da cera de carnaúba que provém da palmeira que tem como nome científico (*Copernicia prunifera*), a qual pode ser caracterizada como um exsudato vegetal típico do nordeste brasileiro. Desse modo, a cera é obtida pelo processamento do pó extraído das folhas, e sua adesão em um sistema atua com propriedades de barreira de blindagem, sem afetar sua toxicidade e a biodegradabilidade (Mattos et al., 2017; Rodrigues et al., 2014; Chiumarelli et al., 2012).

Diante do exposto, a Carnaubeira é uma espécie que merece destaque, por seu amplo aproveitamento de seus componentes seja folha, fruto, bagana e cera, e que já vem sendo explorado na alimentação animal. Com ênfase nos cerídeos que apresentam um grande potencial para a produção animal, o que inclui uma administração segura na microencapsulação sem alterações reprodutivas e produtivas, devido às suas características inertes.

Frente a isso, outro lipídio pertinente que apresenta características desejáveis a serem aplicadas na microencapsulação é a cera de abelha, um produto natural e de origem animal, oriundo das glândulas presentes no abdômen de abelhas. Levando em consideração esses aspectos, a matriz lipídica de cera de abelha apresenta requisitos para um excelente revestimento, salientando resistência à umidade, hidrofobicidade, como também ponto de fusão tutelável para homogeneidade no envolvimento (SOUZA et al., 2017).

Com isso, objetivou-se investigar ureia microencapsulada por liofilização em matrizes lipídicas de cera de abelha e cera de carnaúba, com e sem adição de enxofre visando à liberação lenta de NNP, contribuindo para a mitigação dos riscos de intoxicação, assim como melhor aproveitamento deste.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Desenvolvimento de ureia microencapsulada e morfologia dos sistemas

As formulações de ureia microencapsulada em matrizes lipídica de cera de carnaúba e cera de abelha foram desenvolvidas pela técnica de emulsificação/liofilização, com proporção fixa entre encapsulante e núcleo de 2:1 (m/m) para todos os sistemas: CAUS (Cera de abelha:ureia:enxofre), CCUS (Cera de carnaúba:ureia:enxofre), CAU (Cera de abelha: ureia), CCU (Cera de carnaúba: ureia), correspondente a inclusão de 33,3% de ureia, enquanto nos sistemas que foram enriquecidos com enxofre, a proporção entre a fonte de N e a de S (Sulfato de magnésio heptaidratado) foi de 10:1, respectivamente.

Os sistemas microencapsulados contendo ureia e como encapsulantes cera de carnaúba e abelha foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Netto (2018) e Carvalho (2019), respectivamente. Para preparar os respectivos sistemas, as massas correspondentes de ureia, sulfato de magnésio heptaidratado, cera de abelha e carnaúba foram devidamente pesadas separadamente em balança analítica Adventurer AR 2140 (Marca Ohaus, Parsippany, Estados Unidos®) em béqueres separados, e a ureia foi dissolvida em água destilada.

Em seguida, cada cerídeo anteriormente pesado foi fundido em banho maria, sob temperatura de 85 °C, onde permaneceu para incorporação da ureia e fonte de enxofre.

Antes de incorporar o núcleo, ao béquer contendo a cera fundida foi adicionada a lecitina de soja (volume correspondente a 7% com base na massa de cera), sendo um estabilizante e emulsificador próprio para formulação de emulsões do tipo fase aquosa dispersa em fase oleosa (A/O). Antes de ser adicionada, a solução de ureia foi acrescida da solução de enxofre (Para os sistemas que foram enriquecidos) e ambas foram previamente aquecidas no banho maria até a mesma temperatura da cera fundida e, posteriormente, adicionadas lentamente à cera, seguida de agitação constante de 12000 rpm por 5 min com agitador mecânico. Por fim, as emulsões referentes às formulações CAUS, CCUS, CAU, CCU foram transferidas para recipientes plásticos e identificadas e congeladas em freezer horizontal a -25 °C por 24 h.

Após esse período, as emulsões congeladas foram submetidas à secagem principal em liofilizador Alpha 1-4 LD Plus (Marca Christ, Osterode AM Harz, Alemanha®), sob

pressão de 0,011 mbar e temperatura de -60 °C por 24 h, seguida de secagem complementar em estufa a 55 °C por 6 h.

Por fim, os sistemas microencapsulados foram acondicionados em recipientes fechados, temperatura ambiente, sem incidência de luz para posteriores caracterizações e testes.

## 2.2. Rendimento e eficiência da microencapsulação

O rendimento de microencapsulação se baseia nas massas de ureia, lecitina de soja, do cerídeo e da fonte de enxofre (Para os sistemas que foram enriquecidos) utilizadas no preparo das emulsões e na massa final após a secagem, calculado por meio da equação (1) seguinte:

$$RM = \left( \frac{MF}{MI} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde: RM = Rendimento de microencapsulação; MF: Massa final de microesferas secas; MI = Massa inicial dos constituintes.

A eficiência de microencapsulação avaliou a capacidade de retenção de ureia pelas matrizes de cera carnaúba e abelha e assim 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:

$$\%EM = \left( \frac{Ureal}{Uteórica} \right) \times 100 \quad (2)$$

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

### **2.3. Termogravimetria (TG) e Colorimetria exploratória diferencial (DSC)**

As curvas TG foram obtidas em analisador térmico TGA/SDTA 851 (Marca Mettler Toledo, Columbus, Estados Unidos®), sob atmosfera de ar sintético (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 avaliar a estabilidade térmica foi a  $T_o$ , proposta na ASTM E 2550-17, definida como o ponto em que ocorre uma deflexão (desvio) na curva TG devido ao início da perda de massa. Para determinação da  $T_o$  traçou-se (Na curva TG) uma linha de base extrapolada, observando o ponto em que ocorre a deflexão.

As curvas de DSC dos materiais foram obtidas em um equipamento DSC-50H (Marca Shimadzu, Quioto, Japão®), sob atmosfera inerte (Fluxo de 50 mL/min), taxa de aquecimento de 10 °C/min em uma faixa de temperatura entre 30 e 200 °C, utilizando cadinho hermético de alumínio contendo cerca de 5 mg de amostra.

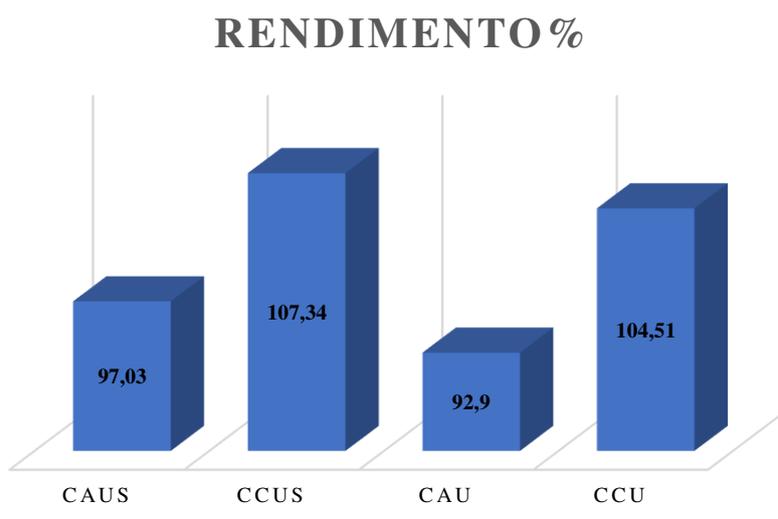
### **2.4. Análise de nitrogênio nos sistemas microencapsulados**

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

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

As caracterizações realizadas a seguir visaram aprofundar o conhecimento sobre os sistemas microencapsulados lipídicos de cera de abelha e carnaúba contendo ureia com e sem enriquecimento de enxofre. Conforme já mencionado, foram preparados quatro sistemas microencapsulados, onde por conveniência serão reportados como CAUS (Cera de abelha:ureia:enxofre), CCUS (Cera de carnaúba:ureia:enxofre), CAU (Cera de abelha:ureia), CCU (Cera de carnaúba:ureia), além de U, CC e CA para ureia, cera de carnaúba e cera de abelha, respectivamente.

Com o intuito de averiguar a viabilidade da emulsificação/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.** Rendimento de microencapsulação das microesferas

Todos os sistemas microencapsulados apresentaram altos valores de rendimento, confirmando a adequação da técnica de microencapsulação utilizada. Os rendimentos acima de 100% observados para CCU e CCUS é possivelmente presença de água. Isso se justifica devido à alta dureza da cera de carnaúba, o que acaba dificultando a saída de água durante a secagem. Percebe-se que essa possível água remanescente aumenta com adição de enxofre, o que pode ser explicado pela higroscopicidade da fonte utilizada do sulfato de magnésio heptaidratado. Os rendimentos observados foram aproximados e/ou superiores aos

encontrados por Carvalho et al. (2019), que por método de secagem por emulsificação/liofilização avaliou duas formulações microencapsuladas utilizando cera de abelha como encapsulante de ureia sem fonte de enxofre (2:1) e ureia com fonte de enxofre (2:1), a qual obteve valores de 92,53 e 90,80%, respectivamente.

A Tabela 1 apresenta as porcentagens da eficiência de microencapsulação, teor de ureia (U) retida nas matrizes lipídicas (CA e CC) e o teor equivalente de proteína bruta das formulações.

**Tabela 1.** Média e desvio padrão (DP) para a quantificação do nitrogênio (N) total, teor de proteína bruta, teor teórico de ureia, teor real de ureia e eficiência da encapsulação.

Formulações 2:1	Uteórica (%)	Ntotal (%)	PB (%)	Eficiência de microencapsulação (%)	Teor real Ureia (%)
CAUS	33,33	17,27 ±1,65	107,94 ±10,32	97,15 ±9,28	32,35 ±3,09
CCUS	33,33	13,45 ±0,43	84,06 ±2,71	75,65 ±2,44	25,19 ±0,81
CAU	33,33	17,46 ±0,38	109,12 ±2,39	98,29 ±2,15	32,71 ±0,72
CCU	33,33	16,79 ±0,33	104,93 ±2,06	94,46 ±1,85	31,45 ±0,62

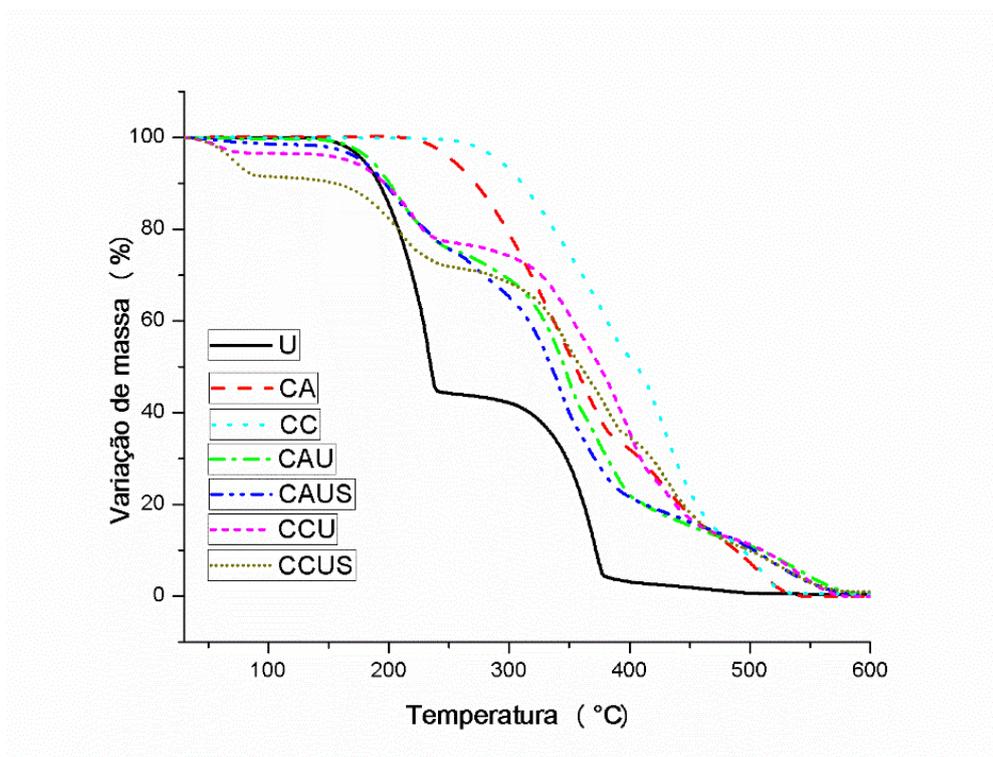
CAUS: Cera de abelha ureia e enxofre; CCUS: Cera de carnaúba ureia e enxofre; CAU: cera de abelha ureia e enxofre; CCU: cera de carnaúba ureia e enxofre; em microencapsulada; Uteórica: Teor teórica de ureia inserida; N: Nitrogênio total; PB: Proteína bruta; Ureal: Teor real de ureia retido.

A eficiência de microencapsulação para CAU, CAUS, CCU e CCUS foi 98,29; 97,15; 94,46 e 75,65%, respectivamente. Observou-se que os sistemas microencapsulados apresentaram elevados valores de ureia retida, o que indica ser viável a escolha das ceras como encapsulantes, tendo CCUS apresentado a menor retenção de ureia. Como sugerido nos resultados de rendimento, os sistemas com cera de carnaúba possivelmente possuem maior teor de umidade, cujo aumento desta acaba diminuindo o teor final de ureia, com reforço desta diminuição com a inclusão da fonte de enxofre, o que explica a menor retenção para esse sistema. Carvalho et al. (2019) ao avaliar micropartículas de cera de abelha contendo ureia com e sem adição de enxofre constatou que a inclusão de enxofre diminuiu a retenção de ureia, conforme ocorrido no presente estudo para ambas as ceras.

Ao avaliar a eficiência de microencapsulação da ureia como núcleo em matriz lipídica, Medeiros et al. (2018), Carvalho et al. (2019) e Netto et al. (2019) encontraram valores entre 97 e 99%.

A Termogravimetria foi empregada para avaliar o comportamento térmico de todos os materiais no estudo (Núcleo, encapsulantes e micropartículas) e desta forma obter

informações sobre as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias e estabelecer a faixa de temperatura que elas começam a se decompor. Na Figura 2 abaixo encontram-se as curvas termogravimétricas das fases da ureia, ceras e dos sistemas microencapsulados.



**Figura 2.** Curvas termogravimétricas (TG) para ureia (U), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e sistemas microencapsulados (CAU, CAUS, CCU e CCUS).

De maneira geral, U apresentou dois principais estágios de degradação térmica enquanto CA e CC apenas um estágio. Já os sistemas microencapsulados apresentaram uma combinação de estágios de degradação provenientes da U e respectiva cera, estando o primeiro evento relacionado à umidade, cujos valores foram 0,3; 1,6; 3,4 e 8,3% para CAU, CAUS, CCU e CCUS, respectivamente. Esses valores de umidade estão em concordância com o abordado anteriormente nos resultados de rendimento e eficiência de microencapsulação e confirmam que as microesferas de cera de carnaúba possuem maior teor de água, o que se intensifica com a inclusão da fonte de enxofre.

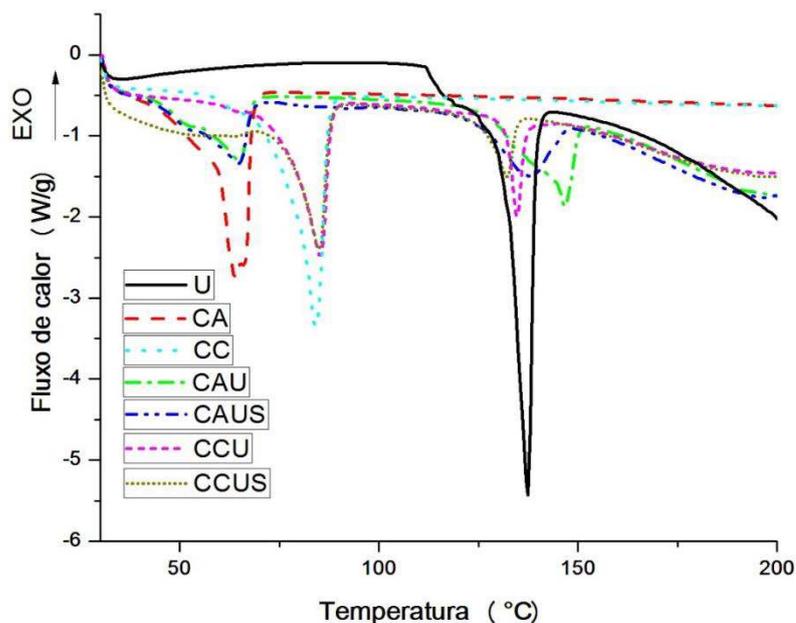
A partir das curvas TG, U, CA e CC apresentaram  $T_0$  (Temperatura inicial de degradação) em 147, 223 e 254 °C, respectivamente, enquanto CAU, CAUS, CCU e CCUS em 156, 151, 151 e 147 °C, respectivamente, sendo valores superiores em relação à U, já

CCUS manteve o mesmo valor de U. Considerando que a ureia possui menor estabilidade térmica do que ambas as ceras, nos sistemas microencapsulados a degradação térmica se inicia por ela. Desta forma, observou-se discreta melhora na temperatura inicial de degradação da ureia após microencapsulação, com exceção de CCUS, cujo valor se manteve. As formulações que receberam S apresentaram menor valor de  $T_0$  em comparação às formulações de mesmo cerídeo que não receberam. A presença de S aumenta a possibilidade de U superficial, o que pode ter influenciado nessa diminuição na estabilidade térmica, assim como há o efeito do uso de um sal metálico como fonte de S (Sulfato de magnésio heptaidratado), pois este acaba atuando como propagador de calor no interior da micropartícula, o que também ajuda a entender a diminuição da temperatura inicial de degradação para os materiais com S.

Carvalho et al. (2019) ao investigar a estabilidade térmica de micropartículas lipídicas contendo ureia com e sem enxofre também observou diminuição na temperatura inicial de degradação após a inclusão da fonte de enxofre. De maneira geral, apesar da cera de carnaúba ter maior estabilidade térmica, maior ponto de fusão e maior dureza que a cera de abelha, ambas oferecem proteção à ureia frente à temperatura em comparação com a ureia livre, proteção esta que pode se reproduzir no ambiente ruminal, possibilitando liberação gradual e otimizando o aproveitamento deste ingrediente pelo animal.

No tocante à Calorimetria exploratória diferencial (DSC), os dados extraídos das curvas de DSC encontram-se na figura 3.

As curvas de DSC exibiram evento endotérmico para CA, CC e U com picos em 64, 84 e 137 °C, respectivamente, atribuídos à fusão destes. Já as curvas de DSC dos sistemas microencapsulados apresentaram a combinação dos dois eventos endotérmicos das fases isoladas (Cera e U), referentes, como já mencionado, à fusão da ureia e do respectivo cerídeo. Os resultados revelam que a temperatura de fusão das ceras nos sistemas microencapsulados não variou quando comparada às ceras isoladas, confirmando a compatibilidade química entre o núcleo e encapsulantes, assegurando proteção, sem ocorrência de interação que possa comprometer a liberação da U quando desejado.



**Figura 3.** Curvas de DSC para ureia (U), cera de abelha (CA), cera de carnaúba (CC) e sistemas microencapsulados (CAU, CAUS, CCU e CCUS).

A manutenção do ponto característico de fusão das ceras também indica que é seguro armazenar as micropartículas ou utilizá-las em processamento que envolva calor até cerca de 64 °C para os sistemas com CA e 84 °C para os sistemas com CC. Da mesma forma, a cera de carnaúba (CC) apresentou ponto de fusão similar aos encontrados por Milanovic et al. (2010) e Leite et al. (2011), em que o ponto de fusão para a cera de carnaúba foi entre 83 e 84°C. Os pontos de fusão da cera de abelha estão de acordo com Barros et al. (2009) e Carvalho et al. (2019), em torno de 64 °C.

Na temperatura em que a ureia funde (137 °C para a ureia livre), observou-se um aumento na temperatura de fusão da U em CAU (146 °C), indicando que, mesmo após fundida, a cera de abelha consegue proteger a ureia. Esse aumento de temperatura de fusão da ureia para CAU quando comparada à ureia livre também foi observado por Carvalho et al. (2019), apresentando um ponto de fusão para a ureia no sistema microencapsulado de 142,75 °C.

A ureia na formulação CAUS manteve mesma temperatura de fusão da ureia livre (137 °C), enquanto para CCU e CCUS a ureia apresentou ponto de fusão em 135 e 132 °C, respectivamente, estando de acordo com os resultados encontrados na literatura, que são entre 125 e 150 °C (FERNANDES et al., 2015).

Esses resultados corroboram o observado nas curvas TG, em que a inserção da fonte de S diminuiu a estabilidade térmica da ureia nos sistemas microencapsulados em comparação com as respectivas micropartículas sem S, pelas mesmas razões já mencionadas anteriormente, assim como as curvas TG, através da  $T_0$ , já apontava uma maior temperatura inicial de degradação da ureia em CAU, o que se reproduziu nas curvas de DSC através de uma maior temperatura de fusão para este sistema.

CAU, CAUS, CCU e CCUS apresentaram valores de  $A_w$  de  $0,47 \pm 0,010$ ;  $0,50 \pm 0,010$ ;  $0,69 \pm 0,004$  e  $0,72 \pm 0,001$ , respectivamente. De acordo com Gock et al. (2003) o valor mínimo de  $A_w$  para desenvolvimento microbiano é de 0,7. Desta forma, constatou-se que os sistemas microencapsulados apresentaram valores adequados, sendo microbiologicamente estáveis, com atenção para CCUS, conforme já esperado e explanado anteriormente, este sistema apresentou maior teor de água, conseqüentemente apresentando discreto aumento na atividade de água em relação ao valor desejável e em comparação aos demais materiais.

#### 4. CONCLUSÃO

O desenvolvimento de microesferas lipídicas contendo ureia por emulsificação/liofilização mostrou-se satisfatório quanto à técnica de microencapsulação escolhida, assim como em relação aos encapsulantes utilizados. Embora todos as micropartículas estudadas tenham apresentado bons resultados de rendimento e retenção da fonte de NNP, assim como ambas as ceras tenham oferecido proteção à ureia, de maneira geral, os sistemas com cera de abelha se sobressaíram, em especial sem a inclusão da fonte de enxofre, cuja inserção, de acordo com essas caracterizações preliminares e sendo necessários outros testes para aprofundamento, possivelmente seja mais viável junto aos demais ingredientes da dieta, não comprometendo a liberação gradual pretendida para a ureia no rúmen.

## 5. REFERÊNCIAS

Aoac. Official Methods of Analysis. Method 969.38. 19th ed., 2012.

Azeredo, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.

Azevedo, H. O.; BARBOSA, F. A.; GRAÇA, D. S.; PAULINO, P. V. R.; SOUZA, R. C.; LAVALL, T. J. P.; BICALHO, F. L. Ureia de liberação lenta em substituição ao farelo de soja na terminação de bovinos confinados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.50, n.11, p.1079-1086, 2015.

Barreto, A. R.; RAMÍREZ-MÉRIDA, L. G.; ETCHEPARE, M. A.; JACOB-LOPES, E.; MENEZES, C. R. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. *Ciência e Natura*, v. 37, p. 164-174, 2015.

Barros, A. I. R. A; NUNES, F. H. F. M.; COSTA, M. M. F. D. Manual de Boas Práticas na Produção de Cera de Abelha. Lisboa: Princípios gerais, 2009.

Carvalho, A. de B.; Silva, A.L.da; Silva, A. M. de A.; Netto, A.J.; Medeiros, T. T. B. de; Araújo Filho, J. M.; Agostini, D. L. da S.; Oliveira, D. L. V. de; Mazzetto, S. E.; Kotzebue, L. R. V.; Oliveira, J. R.; Oliveira, R. L.; Bezerra, L. R. Effect of slow-release urea microencapsulated in beeswax and its inclusion in ruminant diets. *Small Ruminant Research*, Vol. 179, Pag. 56-63, October 2019.

Chiumarelli, M., HUBINGER, M. D. “Stability, solubility, mechanical and barrier properties of cassava starch – Carnauba wax edible coatings to preserve fresh-cut apples”, *Food Hydrocolloids*, v. 28, n. 1, pp.59-67, 2012.

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.

- Gallo, S. B.; PEREIRA, E. C. A.; REIS, V. A. A. Uso de duas fontes de ureia na dieta de cordeiros mestiços terminados em sistema semi-intensivo. *Boletim de Indústria Animal*, v.72, n.1, p.8-13, 2015.
- García-ceja, A.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *Lwt - Food Science and Technology*, v. 63, n. 1, p. 482-489, 2015.
- Gonsalves Neto, J.; Pedreira, M. S.; Alves, E. M.; Santos, E. J.; Silva, A C.; Freire, L. D. R.; Perazzo, A. F.; Pereira, D. M. Tipos de ureia e fontes de carboidratos nas dietas de cordeiros: desempenho, digestibilidade. *Revista electrónica de Veterinaria*, v. 18, n. 9, p. 1-11, 2017.
- Gock, M. A.; HOCKING, A. D.; PITT, J.I.; POULOS, P.G. Influence of temperature, water activity and PH growth of some xerophilic fungi. *Internacional journal of food Microbiology*, V. 81, p.11-19,2003
- Kuck, L. S., & Noreña, C. P. Z. (2016). Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. *Food chemistry*, 194, 569-576.
- Leite, L. F. M.; FILHO, L. R. S.; ASSUMPCÃO, D. F.; NASCIMENTO, L. A. H.; MARTINS, A. T.; CRAVO, M. C. C. Composição e processo de preparação de ligante asfáltico modificado por cera de origem natural. Brasil. PI0901484-5 A2, 2011.
- Maciel, L. P. A. A. Diferentes fontes de nitrogênio na alimentação de cabras leiteiras. 2017. 67 p. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2017.

- Matté, G. M., & Rosa, S. (2013). A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. *Revista Iberoamericana de polímeros*, 14(5), 206- 218.
- Mattos, D. G., PAIVA, P. D. O., NERY, F. C., et al., “Water relations in post-harvested torch ginger affected by harvest point and carnauba wax”, *Postharvest Biology And Technology*, v. 127, pp.35-43, 2017.
- Medeiros, T. T. B. de; Silva, M. de A. S.; Silva, A. L. da; Bezerra, L. R.; Agostini, D. L. da S.; Oliveira, D. L. V. de; Mazzetto, S. e; Kotzebue, L. R. V.; Oliveira, J.R.; Souto, G. S. B.; Carvalho, A. de B.; Netto, A. J.; Oliveira, R. L. Carnauba wax as a wall material for urea microencapsulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, September 2018.
- Milanovic, J.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; RAJIC, N.; NEDOVIC, V.; BUGARSKI, B. Microencapsulation off lavores in carnaúba wax. *Sensors*, v.10, p. 901-912, 2010.
- Nazzaro, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, p. 182186, 2012.
- Nedovica, V.; KALUSEVICA, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVICA, S.; BUGARSKIB, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, v. 1 p. 1806 -1815, 2011.
- Neto, J. P. de C.; Bezerra, L.R.; Silva, A. L. da; Moura, J. F. P. de; Filho, J. M. P.; Filho, E. C. da S.; Guedes, A. F.; Araújo, M. J.; Edvan, R. L.; Oliveira, R. L... Methionine microencapsulated with a carnauba (*Copernicia prunifera*) wax matrix for protection from degradation in the rumen. *Livestock Science*, July 2019.
- Netto, Tonio Joelson. Microesferas de cera de carnaúba contendo ureia na dieta de ovinos: obtenção, caracterização, consumo, digestibilidade e perfil metabólico. *Dissertação de mestrado*. Universidade Federal de Campina Grande – PB, 2018.

- Ray, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, v. 13, p. 76-83, 2016.
- Rodrigues, D. C., CACERES, C. A., RIBEIRO, H. L., et al., "Influence of cassava starch and carnauba wax on physical properties of cashew tree gum-based films", *Food Hydrocolloids*, v. 38, p.147-151, 2014.
- Santana neto, J. A.; OLIVEIRA, V. S.; SANTOS, A. C. P.; VALENÇA, R. L. Distúrbios metabólicos em ruminantes – Uma Revisão. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v.8, n.4, p.157-186, 2014.
- Shishir, M. R. I., Xie, L., Sun, C., Zheng, X., & Chen, W. (2018). Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 34-60.
- Silva, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.
- Souza, C.; FREITAS, A. P.; CAMPOS, P. M. B. G. Topical Formulation Containing Beeswax-Based Nanoparticles Improved In Vivo Skin Barrier Function. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 2017.
- Ye, Q., Georges, N., & Selomulya, C. (2018). Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. *Trends in Food Science & Technology*, 78, 167-179.



## CAPÍTULO II

---

**Avaliação *in situ* de parâmetros ruminais e metabólicos em ovinos recebendo  
dieta à base de microesferas lipídicas contendo ureia**

## **Avaliação *in situ* de parâmetros ruminais e metabólicos em ovinos recebendo dieta à base de microesferas lipídicas contendo ureia**

### **Resumo**

A avaliação do fluido ruminal é de suma importância para detectar desordens metabólicas evitando prejuízos econômicos e proporcionando o bem estar animal. Objetivou-se avaliar *in situ* a influência de ureia microencapsulada em diferentes matrizes lipídicas com e sem inclusão de enxofre na dieta de ovinos, quanto aos parâmetros: pH, temperatura ruminal, contagem de protozoários no fluido ruminal, como também densidade e locomoção, aspectos físicos e parâmetros sanguíneos. Para o teste *in situ* utilizou-se 2 ovinos, machos, fistulados no rúmen, peso médio de 48,9 kg  $\pm$  5,2 e idade de 2 anos. O período experimental foi composto por 31 dias, sendo 18 dias para adaptação às instalações e às dietas contendo ureia e 13 dias para coleta de dados. Os animais foram alimentados às 8 e 16 h, e a quantidade fornecida era registrada e ajustada diariamente de forma que as sobras fossem de aproximadamente 10% em relação ao consumo do dia anterior, com água fornecida *ad libitum*. Os sistemas microencapsulados não influenciaram nos parâmetros pH e temperatura, os quais se mantiveram dentro dos valores de referência. A utilização das microesferas não interferiu de forma negativa nos constituintes bioquímicos do sangue. Em relação aos parâmetros do fluido ruminal frente aos microencapsulados incubados, houve semelhanças entre as formulações, predominando a coloração verde-oliva, odor aromático característico e consistência levemente viscosa para todos os tratamentos. Portanto, a microencapsulação com os cerídeos oriundos de fontes naturais proporcionou melhor aproveitamento da ureia, reduzindo os riscos de intoxicação animal, favorecendo a administração de maiores teores de inclusão desta na dieta de ruminantes sem prejudicar o seu metabolismo. O sistema CCU estabeleceu a maior média com pH entre os valores de referência da neutralidade (6,45), favorecendo a elevação significativa na densidade populacional de protozoários do rúmen, expressando sua significância de maior média 14,97 protozoários ( $10^6$ /mL). A formulação CAUS promoveu maior densidade e motilidade de protozoário entre as categorias apresentando os respectivos valores de 6,0; 6,88 e 7,5 min para grandes, médios e pequenos. A microestrutura para o último tempo de incubação (48 h) foi investigada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), sugerindo ocorrência de biodegradação, a qual aumenta com a inclusão da fonte de enxofre para ambos os cerídeos estudados.

**Palavras-chave:** bioquímica, liberação lenta, pH e temperatura ruminal, protozoários.

***In situ* degradability kinetics against ruminal and metabolic parameters of sheep fed a diet based on urea microspheres**

**Abstract**

The evaluation of ruminal fluid is of paramount importance to detect metabolic disorders, avoiding economic losses and providing animal welfare. The objective was to evaluate *in situ* the influence of microencapsulated urea in different lipid matrices with and without sulfur inclusion in the sheep diet, regarding the parameters: pH, ruminal temperature, count of protozoa in the rumen fluid as well as density and locomotion, physical aspects and blood parameters. For the *in situ* test, 2 male sheep, fistulated in the rumen, mean weight of  $48.9.4 \text{ kg} \pm 5.2$  and age of 2 years were used. The experimental period consisted of 31 days, with 18 days for adaptation to the facilities and diets containing urea, and 13 days for data collection. The animals were fed at 8 am and 4 pm, and the amount supplied was recorded and adjusted daily so that the leftovers were approximately 10% compared to the previous day's consumption, with water supplied *ad libitum*. The microencapsulated systems did not influence the pH and temperature parameters, which remained within the reference values. The use of microspheres did not interfere negatively with the biochemical constituents of blood. Regarding the parameters of the ruminal fluid against the incubated microencapsulates, there were similarities between the formulations, predominantly olive-green color, characteristic aromatic odor and slightly viscous consistency for all treatments. Therefore, microencapsulation with ceridae from natural sources provided better use of urea, reducing the risks of animal poisoning, favoring the administration of higher levels of inclusion of this in the diet of ruminants without harming their metabolism. The CCU system established the highest mean with pH among the neutrality reference values (6.45), this system favored the significant increase in the population density of rumen protozoa expressing its significance of the highest mean of 14.97 protozoa ( $10^6/\text{mL}$ ). The CAUS formulation promoted greater protozoan density and motility among the categories, presenting the respective values of 6.0, 6.88 and 7.5 min). The microstructure for the last incubation time (48 h) was investigated by scanning electron microscopy (SEM), suggesting the occurrence of biodegradation, which increases with the inclusion of the sulfur source for both cerids studied.

**Keywords:** biochemistry, slow release, pH and rumen temperature, protozoa.

## 1. INTRODUÇÃO

Em primeira análise, a ureia utilizada na nutrição animal é designada como uma fonte de nitrogênio não proteico apresentando um alto potencial em transformar-se em proteína microbiana através da simbiose existente entre os microrganismos ruminais (Eckstein, 2017).

Alves (2014) cita que essa proteína microbiana advinda do rúmen pode suprir mais de 50% dos aminoácidos absorvidos pelos ruminantes, e, portanto, é consagrada como uma proteína de alto impacto biológico. Entretanto o fornecimento de ureia requer adaptação prévia e imprescindivelmente um balanceamento das frações orgânicas na dieta para melhor aproveitamento dos nutrientes, como também controlar os riscos com intoxicação no consumo excessivo.

Diante da constante preocupação com a intoxicação, é crescente a busca de alternativas que visem uma maior sincronização das taxas de degradação. Uma das opções para minorar essa intercorrência é através da tecnologia de microencapsulação que permite revestir a ureia por um envolvimento de camadas de polímeros e/ou ceras vegetais (BITTENCOURT., 2017).

Nesse sentido, a tecnologia de microencapsulação permite uma maior disponibilidade dos níveis de amônia no ambiente ruminal, para que dessa forma haja um maior aproveitamento pelos microrganismos, sem comprometer a saúde e bem-estar do animal (GALLO et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar *in situ* a influência de ureia microencapsulada em diferentes matrizes lipídicas com e sem inclusão de enxofre na dieta de ovinos, quanto aos parâmetros ruminais e metabólicos em diferentes intervalos de tempo.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local do experimento**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal – LANA e no Setor de Caprinos de Ovinos da Fazenda Experimental NUPEÁRIDO do Centro de Saúde e

Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, no município de Patos – PB.

As atividades de microencapsulação de ureia em matrizes lipídicas e teste *in situ* foram cadastradas no Sistema Nacional de Gestão de patrimônio Genético e Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). O projeto desenvolveu-se após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentos com Animais (Protocolo CEUA 36/2020), do Centro de Saúde e Tecnologia Rural, da Universidade Federal de Campina Grande, Estado da Paraíba, Brasil.

## 2.2. Avaliação *in situ*

Para o teste *in situ* foram utilizados dois ovinos, machos, da raça Santa Inês com peso médio de  $48,9 \pm 5,2$  kg e idade de  $28 \pm 2$  meses, fistulados no rúmen, alojados em baias individuais providas de comedouros e bebedouros e distribuídos em galpão coberto.

O período experimental foi composto por 31 dias, sendo 18 dias para adaptação às instalações e às dietas contendo ureia e 13 dias para coleta de dados. Os animais foram alimentados às 8 h e 16 h, e a quantidade fornecida era registrada e ajustada diariamente de forma que as sobras fossem de aproximadamente 10% em relação ao consumo do dia anterior, com água fornecida *ad libitum*.

A fonte volumosa utilizada foi feno de capim Tifton 85 (*Cynodon spp.*) e o concentrado à base de milho, farelo de soja, sal mineral e ureia. O concentrado foi calculado de acordo com a NRC (2007) em 100 kg da seguinte forma: 30,5 kg de milho, 8 kg de farelo de soja, 0,5 kg de ureia e 1 kg do núcleo mineral, que foi fornecido 1,0% do peso vivo dos animais (Tabela 1 e 2). As dietas foram formuladas com proporção volumoso:concentrado de 60:40 para manutenção com ganho de peso médio de 40 kg segundo o NRC (2007)

Os tempos de incubação foram 0, 1/4, 1/2, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 h. A técnica *in situ* realizou-se em sacos de tecido-não-tecido [(TNT - 100g/m<sup>2</sup>-(polipropileno))] com dimensões de 4,5x4,5 cm, fechadas a quente em máquina seladora. Cada saco com aproximadamente 3 g de ureia microencapsulada (nos sistemas lipídicos cera de carnaúba/abelha).

Os sacos foram incubados de forma crescente e por etapas, de modo a serem removidos um por vez a fim de reduzir interferência durante a manipulação no ambiente ruminal. A incubação foi feita para cada sistema microencapsulado por vez, em quaduplicata, totalizando uma quantidade de 288 sacos.

**Tabela 1.** Composição química dos ingredientes das dietas experimentais utilizadas na alimentação dos ovinos.

Item	Ingredientes		
Composição química (g/kg MS)	Feno de Tifton-85	Farelo de soja	Milho moído
Matéria seca (g/kg de MN)	872	887	874
MM	60.3	64.8	15.4
Proteína bruta	54.1	450	81.0
Extrato etéreo	10.8	14.4	30.0
FDN <sub>cp</sub>	728	73.6	128
FDA	371	36.3	13.1

**Tabela 2.** Proporção dos ingredientes das dietas experimentais utilizadas na alimentação dos ovinos.

Ingredientes	Proporção dos ingredientes g/kg MS
Milho moído	305
Farelo de soja	80.0
Ureia	5.0
Sal mineral	10.0
Feno de Tifton-85	600
Nutrientes	Composição química (g/kg MS)
Matéria seca (g/kg de MN)	876
Matéria mineral	56.8
Proteína bruta	107
Extrato etéreo	16.8
Fibra em detergente neutro	482
Carboidratos não fibrosos	293
Nutrientes digestíveis totais	642

### 2.3. Parâmetros ruminiais

Para os parâmetros ruminiais toda amostragem do conteúdo ruminal foi feita em tempos estratégicos durante as coletas dos sacos do teste *in situ*, em cada tempo de incubação do microencapsulado, sendo: 0, 4, 8 e 12 h.

O fluido ruminal foi coletado manualmente em diferentes pontos do rúmen através da fístula, obtendo uma amostra de aproximadamente 200 mL. Após cada coleta o conteúdo

foi filtrado e separado em recipientes (potes coletores de 20 mL) uma quantidade específica para cada parâmetro avaliado.

Imediatamente após cada coleta foi medido o pH e a temperatura, com auxílio de um medidor de pH, termômetro digital portátil, respectivamente. As avaliações qualitativas do fluido ruminal foram realizadas logo após a colheita de uma subamostra, avaliando consistência (líquida ou viscosa), odor (aromático ou intenso) e cor (verde ou verde oliva), por intermédio dos órgãos dos sentidos.

A contagem de protozoários do fluido ruminal foi feita conforme metodologia de Dehority (1977). As análises foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Patos Paraíba.

Em cada coletor de amostra continha 2 mL do inóculo filtrado e 4 mL de solução de M.S.F (formaldeído a 35%, verde de metila e cloreto de sódio). Para realização da contagem de protozoário, as amostras inicialmente foram homogeneizadas com auxílio de um agitador magnético, após realizou-se a leitura em câmara de Neubauer em que foram pipetadas 10 µL em cada área de contagem da câmara e posta uma lamínula por cima para melhorar a visualização dos protozoários.

A leitura procedeu-se em microscópio óptico (Lumen) em aumento de 40x no campo C. No centro destas câmaras há várias linhas perpendiculares com marcações em quadrantes, então realizou-se 4 leituras em cada quadrante. Os resultados finais da contagem foram calculados pela fórmula 7 abaixo:

$$N \times 3 \times 10.000 = np/1mL \quad (7)$$

Em que: N: média das leituras dos quadrantes C (maiúsculo) em mL; 3: diluição do inóculo; 10.000: constante; np: número de protozoários

#### **2.4. Parâmetros sanguíneos**

O procedimento de coleta de sangue dos dois animais realizou-se por punção da veia jugular após a alimentação para a análise do teor de ureia no soro (U), albumina (ALB), creatinina (CRE), proteínas totais (PT), aspartato aminotransferase (AST), colesterol (COL) e triglicerídeos (TRI), por meio de tubos Vacutainer (BD – Becton, Dickinson and Co.,

Franklin Lakes, NJ, EUA) com capacidade para 4,0 mL. As coletas aconteceram simultaneamente aos tempos de incubação dos sistemas microencapsulados. Em cada animal foi inserido um cateter nº16 para facilitar a coleta e atender aos requisitos de bem-estar animal. Para a dosagem de ureia sanguínea, o soro foi obtido por centrifugação dos tubos por 5 min a uma velocidade de 2500 rpm, identificado, armazenado em réplicas em minitubos *Eppendorf* de 1,5 mL e congelado para análise. Os parâmetros sanguíneos foram analisados com kits comerciais (Labtest), com auxílio de procedimentos colorimétricos. As análises foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Campina Grande, Patos – Paraíba.

### **2.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Cada material foi depositado em uma fita dupla face de carbono e as micrografias foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo QUANTA 200, Marca FEI Company), com tensão de aceleração entre 5-15 kV, utilizando detectores de elétrons secundários e retroespalhados.

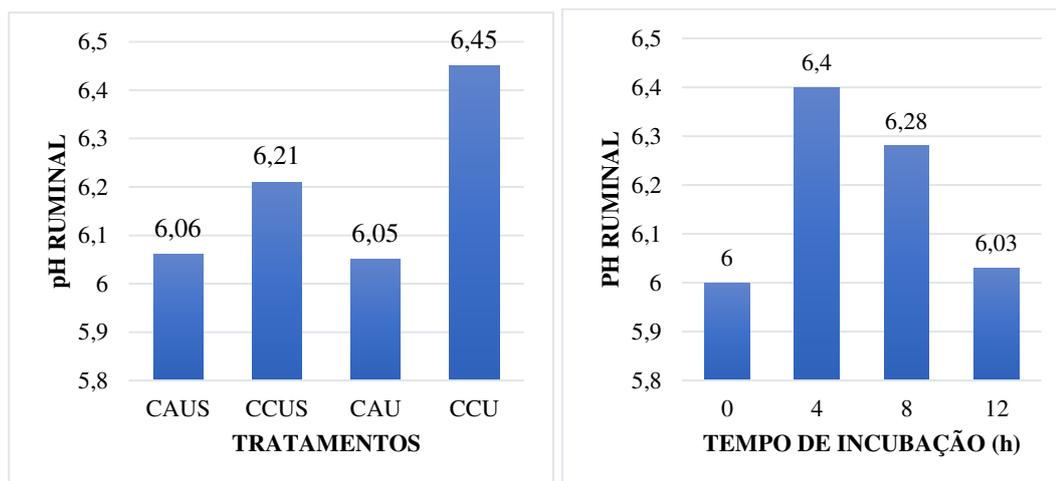
### **2.6. Delineamento experimental e análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados e os tratamentos em parcelas subdivididas, com os animais como bloco, as formulações como parcelas e os tempos como subparcelas.

Os resultados foram analisados e interpretados estatisticamente por meio de análises de variância, adotando-se nível de 5% de probabilidade. Quando pertinente utilizou-se o teste de Tukey para comparação de médias. Todas as análises foram realizadas pelo pacote computacional SAS (2012).

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados apresentados a seguir dizem respeito aos sistemas microencapsulados CAUS, CCUS, CAU, CCU. Na Figura 1 estão os valores de pH dos sistemas microencapsulados.



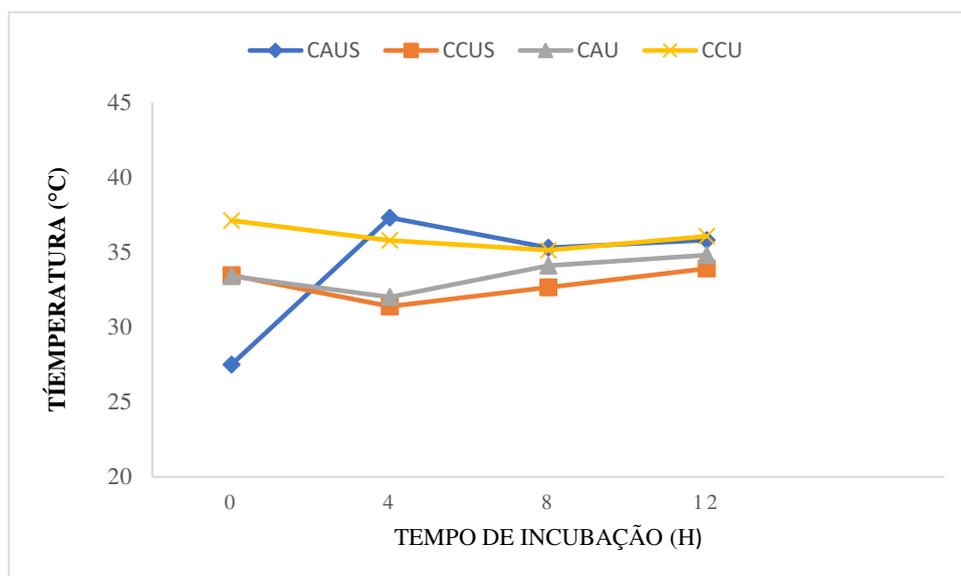
**Figura 1.** Comportamento do pH ruminal de ovinos alimentados com ureia microencapsulada.

Observou-se que as maiores médias em relação aos tempos apresentaram uma variação de 6,40 e 6,28 no tempo de 4 e 8 h. O sistema CCU exibiu a maior média com pH entre os valores de referência da neutralidade (6,45) e as menores médias foram evidenciadas no tempo 0 (6,0) e para o sistema CAU (6,05).

Esses resultados são satisfatórios e concordam com os apresentados por Van Soest (1994), em que para um excelente desenvolvimento de microrganismo celulolíticos, o pH deve estar entre 6,2 a 6,7. Assim como Furtado et al. (2014) reforçam que para um ambiente favorável à proliferação bacteriana é necessário que o pH ruminal mantenha-se entre 6 a 7,20. Já Oliveira et al. (2019) estabelece uma faixa de pH ideal entre 5,5 e 6,8 para que haja um aproveitamento de forma eficiente pelos microrganismos.

De acordo Kaufmann, (1972) o pH ruminal pode ter uma variação no decorrer do dia, como base no horário de ingestão dos alimentos e da composição da ração fornecida. Sendo assim, esses resultados demonstram que a fermentação anaeróbica foi efetiva e que a dieta testada não influenciou na biomassa ruminal, proporcionando assim o controle na capacidade tamponante da saliva, o que foi capaz de manter o pH equilibrado e destacando-se entre a faixa de neutralidade.

Na Figura 2 estão os valores de temperatura dos sistemas microencapsulados.

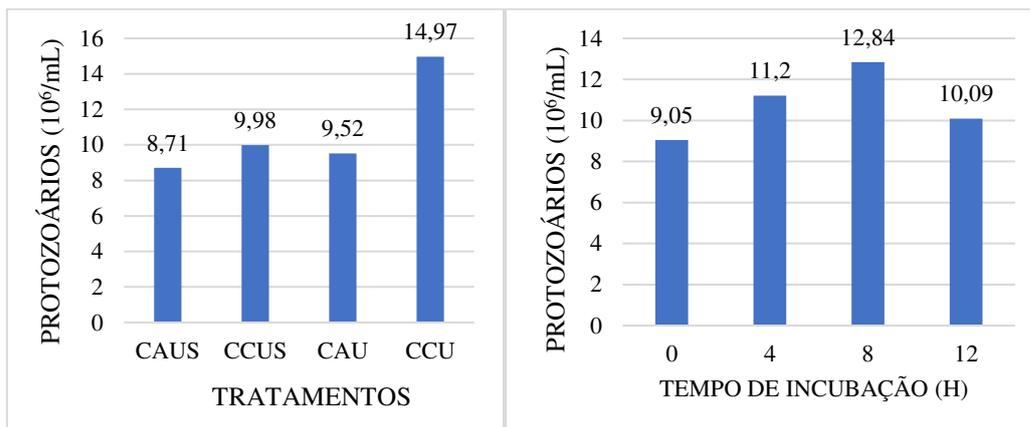


**Figura 2.** Temperatura ruminal de ovinos alimentados com ureia microencapsulada em função do tempo de incubação.

Foram observadas interações significativas entre os valores médios de temperatura ( $P < 0,05$ ) do fluido ruminal. No tempo de incubação 0, CAUS promoveu efeitos significativos, com valor médio de 27,50 °C, enquanto a maior média oscilou na faixa de normalidade equivalente a 37,30 °C no tempo de 4 h do respectivo tratamento. Salientando que o sistema de cera de abelha com adição de enxofre se diferenciou entre os tempos de incubação e entre os demais tratamentos. As médias entre os sistemas CCUS, CCU e CAU e os respectivos tempos oscilaram entre 34 a 36 °C.

De acordo com Berchielli et al. (2006) a temperatura ideal do rúmen deve se manter entre 38 a 42 °C. Desta maneira, percebe-se que o presente estudo se encontra com valores inferiores aos apontados. É válido destacar que durante os dias de coleta foi possível averiguar uma redução na livre demanda de água, principalmente entre os intervalos, o que explica o tempo inicial do tratamento com uma temperatura de 27,5 °C.

Na Figura 3 os valores de contagem de protozoários dos sistemas microencapsulados.



**Figura 3.** Contagem de Protozoários ( $10^6/\text{mL}$ ) do fluido ruminal de ovinos usando microesferas lipídicas contendo ureia em relação aos tratamentos e tempos de incubação.

A quantidade de protozoários no ambiente ruminal para CCU favoreceu a elevação significativa na densidade populacional de protozoários do rúmen, expressando sua significância de maior média  $14,97^a$  protozoários ( $10^6/\text{mL}$ ) e as médias intermediárias se intercalaram entre  $9,98^b$  para CCUS e  $9,52^b$  protozoários ( $10^6/\text{mL}$ ) para CAU. Para os infusórios totais foi observado que às 4 e 8 h após o período de incubação das microesferas, houve um aumento de  $11,20^a$  para  $12,84^a$  protozoários ( $10^6/\text{mL}$ ) na abundância relativa dessa população entre os tempos 0 e 8 h.

A partir da variação da contagem de protozoários, observou-se interação significativa entre os tratamentos ( $P < 0,05$ ), mas não houve em relação ao tempo. Os valores encontrados estão próximos aos preconizado por Kamra (2005), em que os protozoários podem variar entre  $10^4$  até  $10^6$  por mililitro de conteúdo ruminal.

Um dos fatores primordiais que influenciam diretamente o perfil desse ecossistema são as dietas ingeridas, como também compromete a regulação do pH e as relações simbióticas (Arcuri et al., 2006; Martinele et al., 2008). Atenuando-se que a população de protozoários está diretamente correlacionada positivamente com o pH, enfatizando que os valores encontrados do presente trabalho se mantiveram próximos à faixa de normalidade, o que reduz os percentuais dos defaunados.

Desta forma, o equilíbrio fisiológico é suma importância, uma vez que esses parâmetros têm papel decisivo na manutenção da fauna ruminal, visto que, à medida que ocorre o desbalanceamento fora dos padrões toleráveis, compromete-se significativamente a densidade populacional destes microrganismos.

Na Tabela 3, estão descritos os parâmetros do fluido ruminal frente aos microencapsulados incubados.

TRATAMENTOS/ HORAS	VARIÁVEIS			
	COR	ODOR	Consistência	
CAUS	0h	Verde-oliva	Aromático	Viscoso
	4h	Verde-oliva	Aromático	Viscoso
	8h	Verde-oliva	Aromático	Viscoso
	12h	Verde oliva	Aromático	Viscoso
CCUS	0h	Verde-oliva	Aromático	Viscoso
	4h	Verde-oliva	Aromático	Viscoso
	8h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
	12h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
CAU	0h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
	4h	Verde-Oliva	Aromático	viscoso
	8h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
	12h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
CCU	0h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
	4h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
	8h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso
	12h	Verde-Oliva	Aromático	Viscoso

**Tabela 3:** Aspectos físicos do fluido ruminal de ovinos confinados submetidos a dieta com microencapsulados lipídicos contendo ureia para obtenção de liberação lenta.

Constatou-se que os sistemas microencapsulados não influenciaram na cor, odor e consistência do fluido ruminal, assim como não houve variações para estas características, sendo semelhantes para todos os tratamentos. Dessa forma, houve predominância da cor verde-oliva, odor aromático e consistência viscosa.

Conforme Feitosa (2008) esclarece, o odor pode ser classificado em aromático, ácido, repugnante, amoniacal ou inodoro e pode contribuir para o diagnóstico de alterações na fisiologia do ecossistema ruminal. Desta forma, o fluido permaneceu dentro das características favoráveis para proliferação dos microrganismos.

Feitosa (2008) destaca ainda que uma visível viscosidade do meio ruminal pode indicar ação e contaminação da saliva, já a ausência de viscosidade confirma um jejum prolongando do animal e, conseqüentemente, uma inatividade em sua massa microbiana, sugerindo que os microrganismos estavam em um ambiente favorável.

Na Tabela 4 está a avaliação dos parâmetros microbiológicos do fluido ruminal.

TRATAMENTOS/ HORAS		Densidade dos protozoários	Motilidade dos Infusórios
CAUS	0 h	+++	+++ <sup>3</sup>
	4 h	+++	+++ <sup>3</sup>
	8 h	+++	+++ <sup>3</sup>
	12 h	+++	++ <sup>1</sup>
CCUS	0 h	+++	+++ <sup>3</sup>
	4 h	+++	+++ <sup>3</sup>
	8 h	+++	+++ <sup>3</sup>
	12 h	++	++ <sup>1</sup>
CAU	0 h	++	++ <sup>2</sup>
	4 h	+	++ <sup>3</sup>
	8 h	+++	++ <sup>2</sup>
	12 h	+++	++ <sup>2</sup>
CCU	0 h	+++	+++ <sup>3</sup>
	4 h	+++	++ <sup>2</sup>
	8 h	++	++ <sup>2</sup>
	12 h	++	++ <sup>1</sup>

Legenda: +++: identificação dos Infusórios grandes, médios e pequenos; ++<sup>1</sup>: fraca locomoção; ++<sup>2</sup>: boa locomoção e +++<sup>3</sup>: excelente locomoção.

Quanto à classificação do seu tamanho, os protozoários presentes no líquido ruminal podem ser significativamente denotados como grandes, médios ou pequenos, enquanto quanto à quantidade estimada de protozoários, a densidade é classificada como abundante (+++), moderada (++) , escassa (+) ou ausente (fluido inativo sem protozoários) e a motilidade com o mesmo padrão, estando ausente quando os infusórios encontrados estão mortos. São classificados ainda quanto à porcentagem de vivos em relação aos mortos. (DIRKSEN, 1993).

A estimativa da quantidade de protozoários por campo mostrou maior densidade (+++) para (CAUS), quando comparada a (CAU) no tempo de 4 h, mas com boa quantidade de protozoários e uma excelente locomoção (+++<sup>3</sup>).

A densidade do intervalo de 12 h para ambos os sistemas CCUS e CCU apresentou similaridade, com motilidade relativamente fraca. Entretanto, ambos os períodos experimentais apresentaram boa quantidade de parazoários, embora para alguns tempos a locomoção foi mais efetiva.

Levando-se em consideração que o parâmetro dos protozoários deverá ser avaliado logo após a colheita da amostra, a qual mostrará, em casos normais, protozoários bastante móveis, pode-se constatar uma moderada redução nessa motilidade se eventualmente não houver uma agilidade na transferência da amostra do líquido ruminal para ser observado no microscópio óptico (LEEK, 1983). A quantidade dos protozoários também pode sofrer uma variação conforme a composição da dieta, o tempo após a alimentação, e com a parte do rúmen da qual a amostra foi colhida, como também o horário da coleta está susceptível a oscilações nessa estabilidade dos infusórios (ROSENBERGER, 1983).

Na Tabela 5 estão os valores da motilidade dos protozoários (Em minutos).

Protozoários	Tratamentos			
	CAUS	CCUS	CAU	CCU
Grandes	6,00 <sup>a</sup>	4,50 <sup>a</sup>	3,88 <sup>a</sup>	5,00 <sup>a</sup>
Médios	6,88 <sup>a</sup>	4,75 <sup>a</sup>	3,00 <sup>a</sup>	6,25 <sup>a</sup>
Pequenos	7,50 <sup>a</sup>	3,75 <sup>a</sup>	2,88 <sup>a</sup>	6,13 <sup>a</sup>
	0	Tempo 4	8	12
Grandes	8,25 <sup>a</sup>	5,00 <sup>ab</sup>	4,63 <sup>ab</sup>	1,50 <sup>b</sup>
Médios	8,75 <sup>a</sup>	3,88 <sup>ab</sup>	5,63 <sup>ab</sup>	2,63 <sup>b</sup>
Pequenos	8,38 <sup>a</sup>	3,63 <sup>a</sup>	5,13 <sup>a</sup>	3,13 <sup>a</sup>

**Tabela 4.** Avaliação do fluido ruminal de ovinos, em relação aos efeitos dos tratamentos e do tempo na movimentação em função de cada categoria.

Não foi observados efeitos na motilidade entre os tratamentos e tempos. As maiores médias dos tratamentos para a categoria dos pequenos foi de 7,5; 3,75; 2,88 e 6,13 min entre os respectivos sistemas CAUS, CCUS, CAU e CCU.

Observou-se melhor resposta de motilidade para CAUS, para todas as categorias de grandes, médios e pequenos, apresentando os respectivos valores de 6,0; 6,88 e 7,5 min.

Em relação ao tempo de motilidade dos protozoários pequenos, não houve diferença significativa, e as médias se apresentaram semelhantes estatisticamente. Em contrapartida, para os infusórios grandes e médios houve diferença entre o tempo 0 e 12 h, apresentando as menores médias de 1,50 e 2,63 min, respectivamente.

As maiores médias foram observadas no tempo 0 para grandes e médios, intercalando valores entre 8,25 e 8,75 min, respectivamente. E assim, as médias intermediárias estão entre os tempos de incubação de 4 e 8 h, nesse viés, não se diferem estatisticamente dos tempos 0 e 12 h.

No trabalho de Matos et al. (2008) estudando a população de protozoários do rúmen de ovinos criados em pastagem nativa da caatinga de Pernambuco, os resultados apontam diferença significativa no número total de protozoários e concentração média do gênero *Entodinium*, quanto ao horário de coleta das amostras ruminais, sendo maior antes da alimentação, semelhante ao verificado neste estudo onde a densidade de protozoários se manteve mais elevada antes da alimentação.

Assim como Franzolin Neto et al. (1991) detectaram níveis mais elevados de ciliados no momento do arraçamento, decrescendo até 12 h depois, mas aumentando em seguida até o momento imediatamente anterior à oferta da dieta.

Na Tabela 5 estão os parâmetros microbiológicos do fluido ruminal quanto percentagem de infusórios vivos.

Protozoários	Tratamentos			
	CAUS	CCUS	CAU	CCU
Grandes	100	75	62,5	50
Médios	100	100	62,5	75
Pequenos	0	0	37,5	12,5
	Tempo			
	0	4	8	12
Grandes	100	75	75	37,5
Médios	100	75	87,5	75
Pequenos	75	100	75	87,5

**Tabela 5.** Avaliação do fluido ruminal de ovinos, em relação percentagem vivos em função dos tratamentos e do tempo por categoria.

CAUS e CCUS promoveram um maior incremento no número de protozoários em relação ao tratamento para as categorias grandes, médios e pequenos (100%). Essa alta porcentagem pode ser presumida pela presença da fonte de enxofre nos sistemas, o que provavelmente aumentou a incidência superficial de U nas micropartículas. Ao comparar os percentuais entre si, pode-se notar um comportamento similar dos protozoários para as categorias pequenos e médios de 87,5 % dos respectivos tempos de incubação 8 e 12h.

Houve um decréscimo para os ciliados pequenos dos sistemas CAU e CCU apresentando valores de 37,5 e 12,5%, sugerindo defaunação entre a mesma categoria para os sistemas CAUS e CCUS. Essa defaunação pode estar relacionada com o aumento da síntese microbiana seguindo para o duodeno, à produção de propionato, populações fúngicas

no rúmen ou o volume do conteúdo ruminal (JOUANY et al., 1988; JOUANY, 1991; WILLIAMS & COLEMAN, 1992).

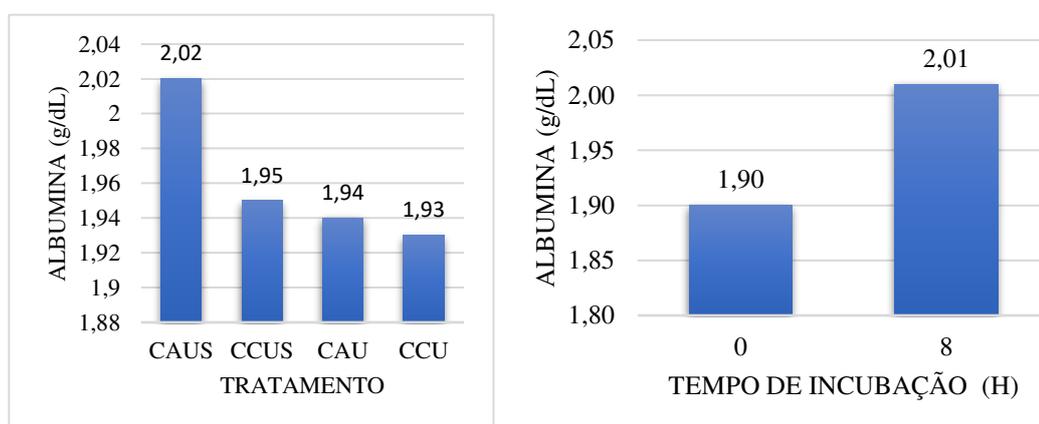
Para Siqueira e D'Agosto (2003), a distribuição dos protozoários ciliados pode apresentar um comportamento influenciável por diversos fatores, entre eles a dieta questão nutricional, pH ruminal, o intervalo de tempo após alimentação e pelas relações constituídas entre eles com as bactérias e fungos.

Kasari (1994) preconiza que para um fluido ruminal de qualidade deve haver uma concentração acentuada de protozoários com a diversidade entre as categorias, corroborando com os resultados desse trabalho, onde se obteve uma variação constante desses infusórios entre todos os sistemas microencapsulados.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos dos animais permitiu avaliar o status nutricional, além dos efeitos metabólicos do manejo nutricional com a inclusão dos sistemas microencapsulados.

Dentre esses parâmetros, cita-se alguns dos metabólitos proteicos que são representados principalmente pelas variáveis: ureia, proteínas totais, albumina, colesterol e triglicérides. Em relação ao funcionamento hepático, uma das principais variáveis é o aspartato aminotransferase (AST), entre outros parâmetros.

Na Figura 4 estão os resultados das concentrações séricas do metabolismo proteico da variável albumina (ALB).



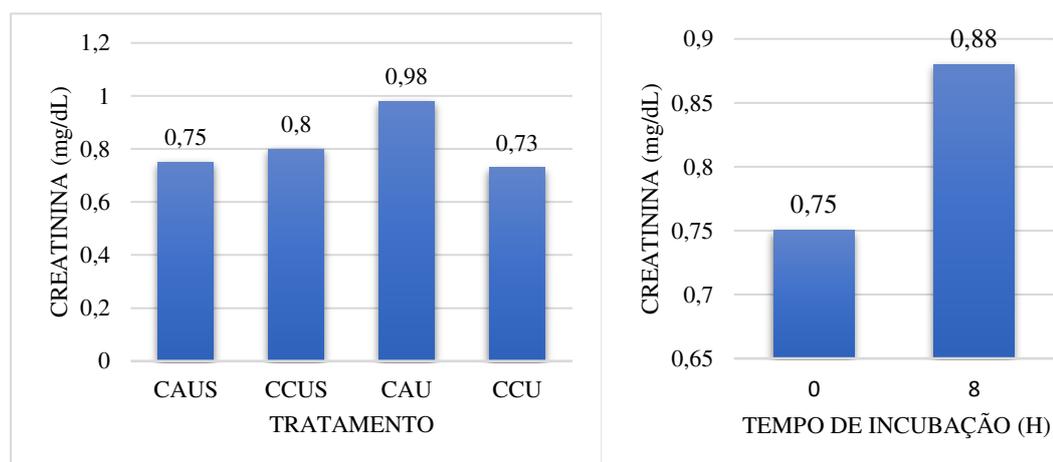
**Figura 4.** Valores de Albumina (g/dL) usando microesferas lipídicas na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação.

Os valores séricos de albumina não apresentaram efeito significativo, sendo o melhor resultado para CAUS, com uma média 2,02 g/dL e uma variação decrescente para os demais tratamentos equivalentes a 1,95; 1,94 e 1,93 g/dL para CCUS, CAU e CCU, respectivamente.

As médias encontradas estão de acordo com os níveis séricos de albumina normais para ovinos que é 2,4 a 3,0 g/dL (González e Silva, 2006), exceto, para os demais sistemas CCUS, CAU e CCU que obtiveram valores mais baixos, porém próximos.

De acordo com a pesquisa feita por Feijó et al. (2014) com ovelhas gestantes e não gestantes, a concentração de albumina das ovelhas não gestantes foi inferior a 2,22 g/dL encontrado nas gestantes, os valores encontrados neste estudo estão corroborando com o presente trabalho. Para que sejam observadas alterações significativas na sua concentração é necessário um período de observação de pelo menos 30 dias (VARANIS, 2018).

Na Figura 5 estão os resultados das concentrações séricas de creatinina (CRE).



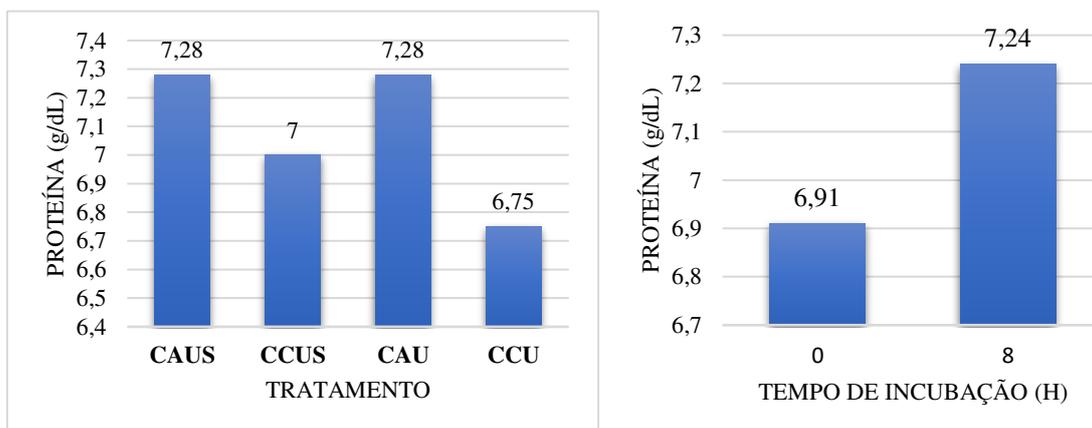
**Figura 5.** Valores de Creatinina (mg/dL) usando microesferas lipídicas na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação.

A inserção da ureia não influenciou a sua concentração de creatinina, cujos valores para as microesferas foram CAUS (0,75 mg/dL), CCUS (0,80 mg/dL), CAU (0,98 mg/dL) e CCU (0,73 mg/dL).

Em relação aos níveis de referência de creatinina, Marques (2007) apresenta o valor médio de 1,86 mg/dL, e Libardini (2014) de 1,4 mg/dL, enquanto Kaneko et al. (2008) estabelece a faixa entre 1,2 e 1,9 mg/dL. Embora próximos, os resultados obtidos foram inferiores aos apontados pelos autores. A alteração dos níveis de creatinina pode ser

independente da dieta, porém, é um indicador de intoxicação, principalmente da ingestão de proteína, sendo usada como referência para indicar se o aumento na concentração de ureia é devido a problemas renais ou à alimentação (CARDOSO et al., 2011).

Na Figura 6 estão os resultados das concentrações séricas de proteínas totais (PT).

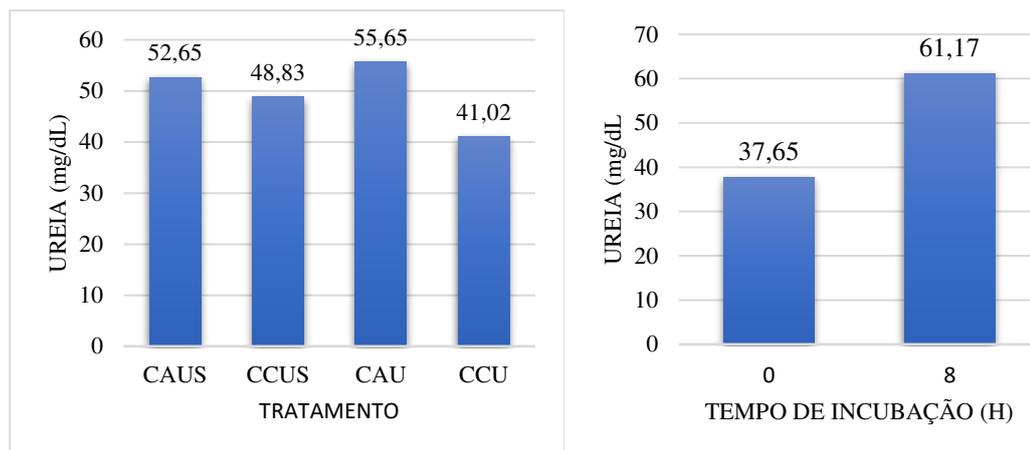


**Figura 6.** Valores de Proteína Total (g/dL) usando microesferas lipídicas na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação.

Não foi observada diferença significativa entre os sistemas microencapsulados quanto aos tratamentos e tempos. Observou-se melhor resposta para (CAUS) e (CAU), onde os valores de PT foram 7,28 g/dL, e para CCUS e CCU com médias de 7,0 e 6,75 g/dL, quanto aos tempos de incubação 0 e 8 h apresentaram concentrações com médias de 6,91 e 7,24 g/dL.

Estando dentro dos padrões sugeridos por Meyer e Harvey (2004), em que os valores séricos devem situar-se entre 6 e 7 g/dL e Silva (2019), com intervalos entre 3,1 a 10,7 g/dL. De acordo com esses autores, os valores observados de proteínas totais estão condizentes com os intervalos deste estudo

Na figura 7 estão os resultados de ureia sanguínea.



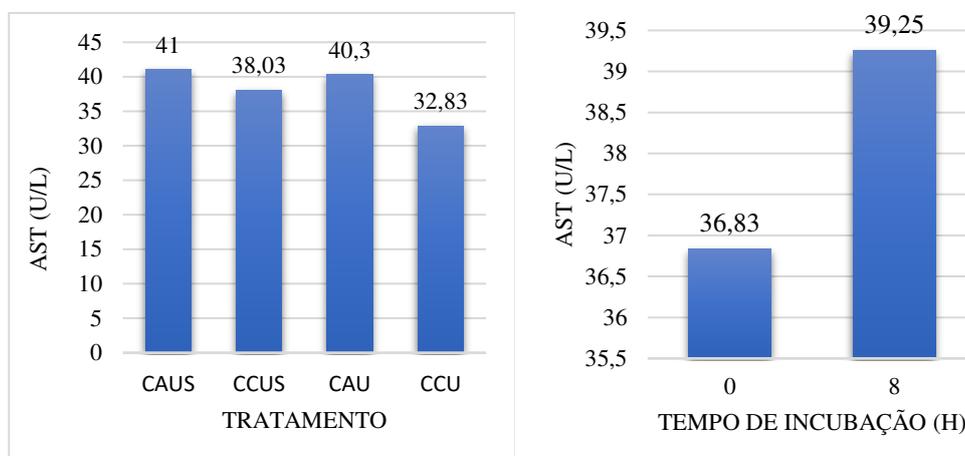
**Figura 7.** Valores de ureia sanguínea (mg/dL) usando microesferas lipídicas na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação.

Em relação às concentrações de ureia no sangue, no presente trabalho foram observados os valores correspondentes a cada tratamento, sendo 52,65; 48,83; 55,65 e 41,02 mg/dL para CAUS, CCUS, CAU e CCU, respectivamente, não havendo diferença significativa para esse parâmetro. Silva (2019) preconiza intervalos mais amplos que os valores internacionais comumente utilizados, com intervalo ideal de 10 a 92 mg/dL para o metabólito ureia em ovinos. Ziguer et al. (2012) obteve médias mais elevadas quanto aos encontrados neste trabalho 63,82 e 62,45 mg/dL de ureia sérica em ovinos alimentados com 1% de ureia encapsulada na dieta total.

Na Figura 8 estão os resultados do metabolismo enzimático de aspartato aminotransferase (AST).

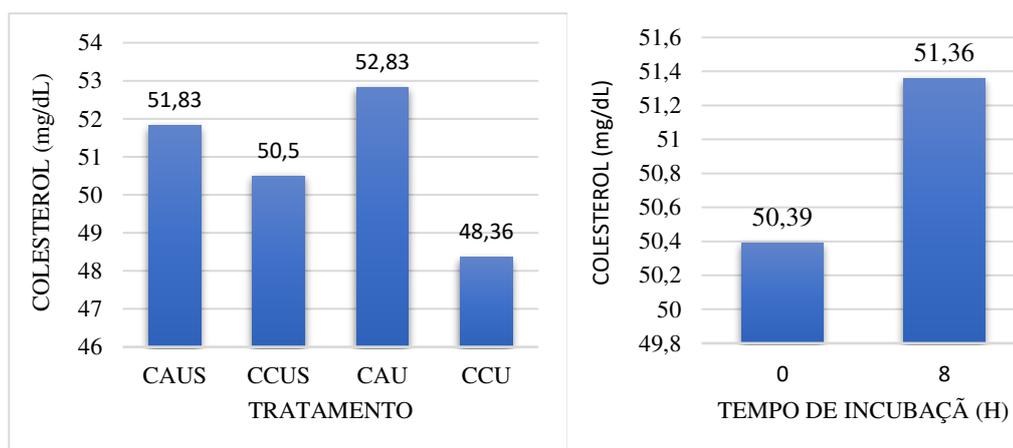
Não houve efeito significativo para AST em relação ao tempo de incubação e de tratamento. A maior média dos sistemas foi obtida para CAUS e CAU com os respectivos valores de 41 e 40,03 U/L. Os resultados apontaram um pequeno decréscimo nos valores entre CCUS e CCU com média de 38,83 U/L e 32,83 U/L e um aumento dos resultados entre os tratamentos CAUS e CAU, as médias intercaladas referentes ao tempo de coleta foi maior para o período de 8 h (39,25 U/L).

Os valores de referência para AST são entre de 60 a 280 U/L de acordo com Kaneko et al. (2008). Entretanto, os sistemas microencapsulados apresentaram AST abaixo dos valores de referência.



**Figura 8.** Concentrações séricas de AST (U/L), usando microesferas lipídicas na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação.

Na Figura 9 estão os resultados das concentrações séricas de colesterol (COL).

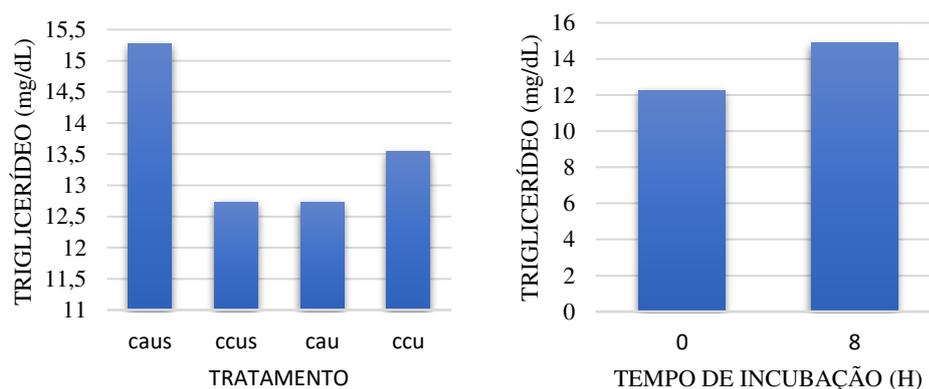


**Figura 9.** Concentrações séricas de Colesterol (mg/dL), usando microesferas lipídicas na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação.

Não houve mudança significativa nas concentrações séricas de colesterol no tempo de coleta de 0 h e 8 h (média: 50,39; 51,36 mg/dL). Em contrapartida, os tratamentos apresentaram maiores concentrações para o CAU (52,83 mg/dL), a menor média observada para CCU (48,36 mg/dL) e os tratamentos CAUS e CCUS permaneceram com valores aproximados variando de 51,83 e 50,5 mg/dL, respectivamente.

González e Silva (2006) estipularam valores de colesterol de referência entre 52-76 mg/dL. Esta variação da concentração de colesterol pode estar relacionada aos fatores da dieta, já que a sua concentração é bastante afetada pelo aporte lipídico. Homem Junior et al. (2010) trabalhando também com cordeiros Santa Inês encontraram médias de colesterol entre 42,9 e 108,6 mg/dL, faixa na qual se encaixam os resultados do presente estudo.

Na Figura 10 estão os resultados das concentrações séricas de triglicerídeos.



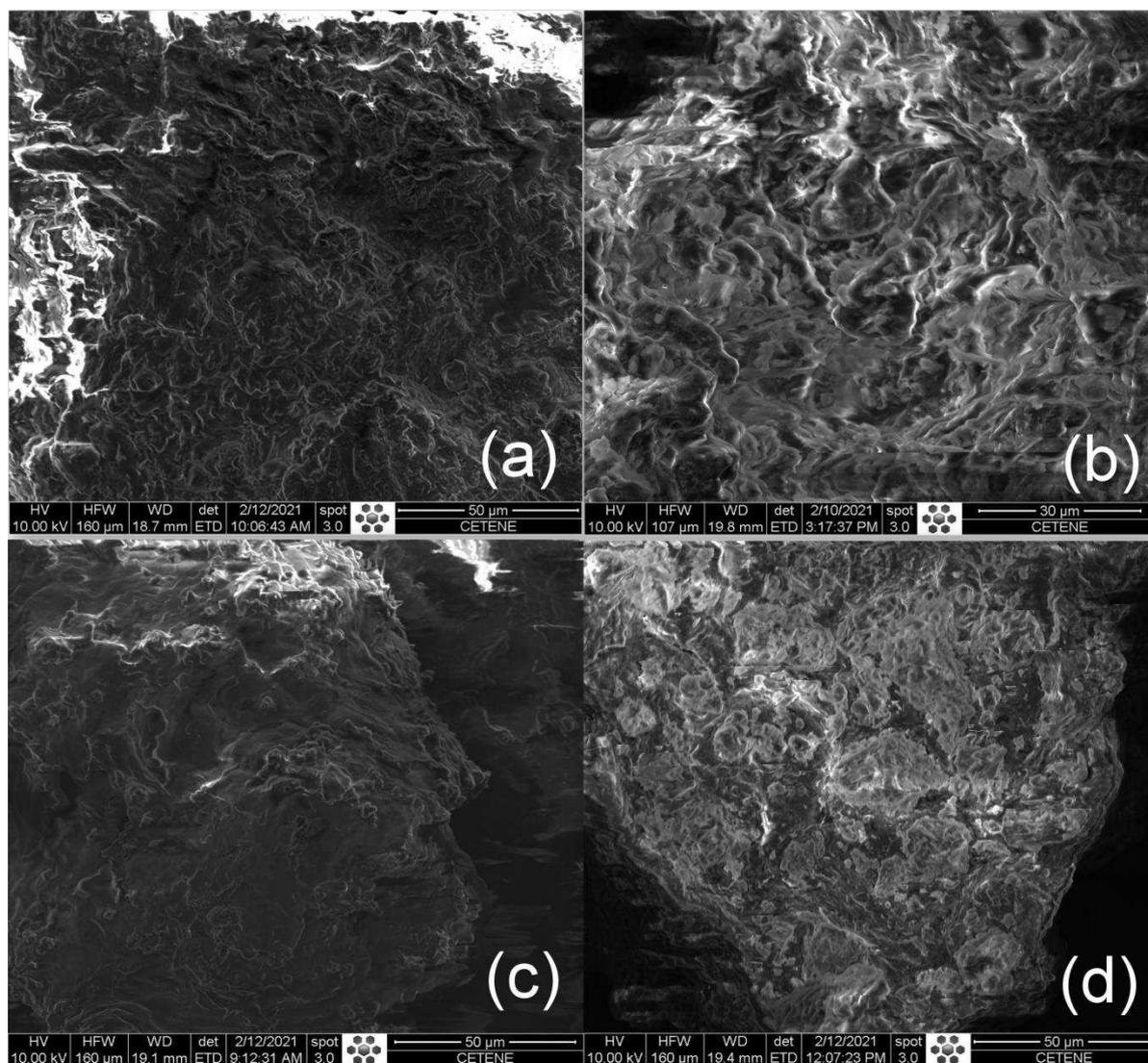
**Figura 10.** Concentrações séricas de e triglicerídeos (mg/dL), usando microesferas lipídicas na alimentação de ovinos fistulados no rúmen em relação ao tratamento e tempo de incubação.

Não houve diferenças nas concentrações de triglicerídeos sanguíneos em relação aos tratamentos avaliados, apesar de CAUS apresentar sutilmente valor superior aos demais (15,27 mg/dL). Os níveis séricos de colesterol para os sistemas CCUS e CAU permaneceram iguais com média de 12,73 mg/dL, enquanto CCU foi 13,54 mg/dL. O intervalo maior em relação ao tempo de coleta de 0 e 8 h se intercalou entre 12,25 e 14,89 mg/dL, respectivamente. Todos esses valores encontram-se próximos aos de referência. Assim como preconiza González e Silva, (2006) estabelecendo estimativas de normalidade entre 17,6 e 24 mg/dL, enquanto Araújo e Silva (2008) recomendaram para caprinos valores de triglicerídeos entre 23,1 e 33,5 mg/dL.

Sob essa ótica, os níveis consideráveis normais desse conteúdo na corrente sanguínea pode, de fato, refletir sobre o estágio de equilíbrio entre absorção no intestino delgado, se sua síntese de secreção nos hepatócitos e absorção pelo tecido adiposo (THRALL et al., 2006 apud CONTI et al., 2015).

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi conduzida com a finalidade de averiguar a integridade da microestrutura no pós-incubação frente ao tempo de exposição

ao ambiente ruminal. As micrografias eletrônicas de varredura obtidas para os sistemas microencapsulados referentes ao último tempo de incubação (48 h) estão reunidas na Figura 11 a seguir.



**Figura 11.** Micrografias eletrônicas de varredura referentes ao material após a incubação do tempo de 48 h: a) CAUS, b) CCUS, c) CAU e d) CCU.

A análise das micrografias foi feita com base em Carvalho (2019) e Netto (2018), cujos respectivos trabalhos englobaram o estudo de ureia microencapsulada em matriz de cera de abelha e de carnaúba, respectivamente. Em suas investigações, ambos os autores obtiveram micrografias dos sistemas microencapsulados antes da incubação, descrevendo-os de forma similar, com superfície lisa, íntegra e sem poros, possibilitando que as

informações obtidas sirvam de parâmetro para comparação com os materiais do presente estudo.

Todos os sistemas microencapsulados apresentaram microestrutura com presença de desgaste superficial, o que pode estar relacionado à ocorrência de biodegradação. Esse desgaste foi mais notório em CCU do que em CAU e se acentuou com a adição da fonte de enxofre para ambos os cerídeos em comparação com a respectiva formulação que não foi enriquecida com enxofre. Esses resultados estão em concordância com o observado nas curvas TG e DSC (Capítulo 1) e também por Carvalho et al. (2019) em relação à influência negativa da microencapsulação da fonte de enxofre junto à de nitrogênio.

De acordo Lopes et al. (2005), biodegradação e difusão são os meios pelos quais os microrganismos ruminais têm acesso a ingredientes microencapsulados em matrizes lipídicas, ocorrendo sempre um meio que prevalece sobre o outro. Entretanto o mecanismo que prevalece é a difusão ou a solubilização, ou seja, a água presente no ambiente ruminal se adere às micropartículas realizando o arraste de ureia para o meio aquoso. Essa prevalência da difusão acontece porque o desaparecimento da fonte de nitrogênio se sobressai em relação à evasão da cera em si só, denotando que, de fato, há presença de biodegradação, embora o principal mecanismo de liberação envolvido seja a difusão da ureia.

Campos et al. (2021), ao estudarem ureia microencapsulada em três matrizes lipídicas de cera de abelha, de carnaúba e gordura vegetal hidrogenada na dieta de cabras em lactação, constaram que a cera de abelha se sobressaiu em relação à de carnaúba, propiciando maior conversão alimentar, maior ingestão de proteína bruta, maior produção de leite, corroborando o constatado no presente estudo, em que a cera de abelha se destacou, possivelmente oferecendo, portanto, uma liberação mais gradual de NNP.

#### 4. CONCLUSÃO

A avaliação *in situ* de parâmetros ruminais e metabólicos demonstraram que sistema o CCU apresentou a maior média com valor de pH próximo ao de referência da neutralidade, assim como esse sistema também favoreceu a elevação significativa na contagem de protozoários no rúmen. Já CAUS promoveu maior densidade e motilidade de protozoários. Os sistemas microencapsulados não interferiram nos parâmetros séricos, em que os valores encontrados estão próximos às faixas de referência. As micrografias após o teste *in situ* para o último tempo de incubação (48 h) apresentaram sinais de biodegradação, a qual se intensifica com a inclusão da fonte de enxofre, podendo comprometer a liberação gradual pretendida para a ureia no rúmen. Dessa forma, conclui-se que o uso dos cerídeos oriundos de fontes naturais como encapsulantes de ureia é uma alternativa promissora, visando proporcionar melhor aproveitamento do NNP, reduzindo riscos de intoxicação animal. De maneira geral, e considerando esta pesquisa em sua completitude, apesar dos bons resultados para ambas as ceras estudadas, há indicativo de que a cera de abelha seja mais adequada na obtenção de microesferas contendo ureia para liberação mais gradual no rúmen, de preferência sem a inclusão da fonte de enxofre no sistema microencapsulado.

#### 5. REFERÊNCIAS

- Alves, E. M. et al. Nitrogen metabolismo and microbial synthesis in sheep fed diets containing slow release urea to replace the convencional urea. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, v. 36, n. 1, p. 55-62, 2014.
- Aoac. *Official Methods of Analysis*. Method 969.38. 19th ed., 2012.
- Araújo G. G. L.; ALBUQUERQUE S. G.; GUIMARÃES FILHO, C. Opções no uso de forrageiras arbustivo-arbóreas na alimentação animal no semiárido do nordeste. *Simpósio Brasil*, p. 1-25, 2006.
- Arcuri, P.B.; LOPES, F.C.F.; CARNEIRO, J.C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. de. *Nutrição dos ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. p.111-140.
- Berchielli, T., Pires, A.V, Oliveira, S.G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, p. 583, 2006.
- Bittencourt, M. Por Dentro do Cocho: Desmistificando a utilização da ureia para ruminantes. Disponível em: <https://agrocereasmultimix.com.br/blog/ureia-para-ruminantes>. 26 de abril de 2017.
- Borges, N. C.; SILVA, L. A. F.; FIORAVANTI, M. C. S.; CUNHA, P. H. J.; MORAES, R. R.; GUIMARÃES, P. L.; MARTINS, M. E. P.; Avaliação do suco ruminal de bovinos “a fresco” e após 12 horas de conservação. *Ciência Animal Brasileira*, v.3, n.2, p. 57-63, 2002.
- Campos, A. C., Silva, A. L., Silva, A. M.A., Araújo Filho, J. M., Costa, T. G. P., Pereira Filho, J. M., Oliveira, J. P.F. Bezerra, L. R. Dietary replacement of soybean meal with lipid matrix-encapsulated urea does not modify milk production and composition in dairy goats, *Animal Feed Science and Technology*, v. 274, 2021, 114763.
- Cardoso, D.; COSTA, M. F. O.; BENATTI, L. A. T.; LAUDARES, K. M.; VAZ JÚNIOR, R. G.; FIORAVANTI, M. C. S. Perfil bioquímico de bovinos de raças localmente adaptadas em sistema intensivo de criação. 2011. In: XIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFG, 2011, Goiânia. Anais VIII Conpeex. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 2011.

Conti, R.M.C. et al. Efeitos de fontes orgânicas de cobre e enxofre sobre os parâmetros bioquímicos no soro de ovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, novembro 2015.

Costa, D. P. B.; SILVA, J. C. G.; MOURÃO, R.C.; RODRIGUES, V. C.; COSTA, Q. P. B.; LIMA, E. S. Microrganismos do rúmen de bovinos e bubalinos castrados e inteiros. *PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 2, n. 34, p.1-11, 2008.

Dehority, B.A. Classification and morphology of rumen protozoa. Ohio: Wooster, 1977. 82p.'

Dirksen G. 2008. Sistema digestivo, p.166-228. In: Dirksen G., Gründer H. & Stöber M. (Eds), *Exame Clínico dos Bovinos*. 3ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

Eckstein, E.I. Alternativas de fontes proteicas na alimentação de ruminantes em substituição ao farelo de soja. 2017. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon.

Feitosa, F. L. F. Semiologia do sistema digestivo de ruminantes. In.: *Semiologia veterinária: a arte o diagnóstico: cães, gatos equinos, ruminantes e silvestres*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 108-138.

Feijó, J. O.; PERAZZOLI, D.; SILVA, L. G. C.; ARAGÃO, R. B.; MARTINS, C. F.; PEREIRA, R. A.; FERREIRA, M. B.; PINO, F. A. D. B.; RABASSA, V. A.; CORRÊA, M. N. Avaliação de parâmetros bioquímicos clínicos de ovelhas do grupo genético pantaneiro gestantes e não gestantes. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 51, n. 2, p. 111 - 117, 2014

Franzolin Neto, R.; NOGUEIRA FILHO, J. C. M.; OLIVEIRA, M. E. fM. Efeitos de dietas com diferentes níveis de proteína sobre os protozoários ciliados no rúmen de búfalos (*Bubalus bubalis* L.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 26, n. 4, p. 487-493, 1991.

- Furtado, R. N.; Carneiro, M.J.D.; Gomes, E.S.F. Rogerio, M. C. P.; Silva, D.S. Balanço de nitrogênio e avaliação ruminal em ovinos machos e alimentadas com rações contendo torta de mamona sob diferentes parâmetros. *Revista Ciências Agrárias*, v.35, n.6, p.3237-3248, 2014.
- Gallo, S. B.; PEREIRA, E. C. A.; REIS, V. A. A. Uso de duas fontes de ureia na dieta de cordeiros mestiços terminados em sistema semi-intensivo. *Boletim de Indústria Animal*, v.72, n.1, p.8-13, 2015.
- González, F.H.D.; SILVA, S.C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 357, 2006.
- Homem Júnior, A. C.; EZEQUIEL, J. M. B.; GALATI, R. L.; GONSALVES, J. S.; SANTOS, V. C.; SATO, R. A. Grãos de girassol ou gordura protegida em dietas com alto concentrado e ganho compensatório de cordeiros em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 2010.
- Jouany, J.P. Defaunation of the rumen. *Rumen Microbial metabolism and ruminant digestion*. Paris, INRA Editions. p. 239-261. 1991.
- Jouany, J.P. et al. Effect of Defaunating the Rumen. *Animal Feed Science and Technology*, Uppsala, v.21, n. 1, p.229-265, 1988.
- Kamra, D.N. Rumen microbial ecosystem. *Curr. Sci.*, v.89, p.125-135, 2005.
- Kaneko, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 5.ª ed, New York: Academic Press, 932p. 1997.
- kasari, T. R. Medical management of common physiologic and metabolic abnormalities in anorectic cattle. *Veterinary Medicine, Lenexa*, v. 89, n. 9, p. 898- 909, Sep. 1994.

- Leek, B. F. Clinical diseases of the rumen: a physiologist a view. *Veterinary Record*, v. 113, p. 10-14, 1983.
- 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.
- Matos, DS; Guim, A; Batista, AMV, Santos, MVF, Correa, IM, Santos, GRA, Lopes, CRA. População de protozoários ciliados no rúmen de ovinos criados na caatinga de Pernambuco. *Revista Brasileira de Saúde e Produção animal*. 2008;9:270-279.
- Marques, K. S. Perfil metabólico de cordeiros em pastejo submetidos a diferentes ambientes e suplementações alimentares no semi-árido paraibano. 2007. 44f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Campo Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos-PB, 2007.
- Meyer, D. J.; Harvey, J. W. *Veterinary laboratory medicine: interpretation e diagnostic. Philadelphia: Saunders, ed. 2, p. 351, 2004.*
- National RESEARCH COUNCIL – NRC. *Nutrient requeriments of small ruminants. 7 ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 2007, p. 362.*
- Oliveira, V. da S.; Santos, A. C. P. dos; Valença, R. de L. Desenvolvimento e fisiologia do trato digestivo de ruminantes. *Ciência Animal*, v. 29, n. 3, p. 114-132, 2019.
- Rosenberger, G. *Exame clínico dos bovinos 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1983, 429p.*
- Silva, D. A. de P. *Valores referência de metabólitos sanguíneos para ovinos no Brasil. Monografia. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG, 2019.*

- Silva, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, 2014.
- Siqueira, I. C. V.; D'AGOSTO, M.; Comportamento e perfil de comunidade de protozoários ciliados no rúmen de bovinos. *Revista Brasileira de Zoociências*, Juiz de Fora, v. 5, n.2, p. 243-252, 2003.
- Thrall, M.A.; BAKER, D.C.; CAMPBELL, T.W.; DeNICOLA, D.; FETTMAN, M.J.; LASSEN, E.D.; REBAR, A.; WEISER, G. Avaliação laboratorial do fígado. In: *Hematologia e bioquímica clínica veterinária*. São Paulo: Roca, 2007. 335-354 p.
- Van Soest, P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*. New York: Cornell University Press, ed. 2, p. 476, 1994.
- Varanis, L. F. M. Prospecção de metabólitos sanguíneos referenciais para ovinos em distintas categorias. 2018. 88 f. Dissertação (mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Uberlândia, 2018.
- Williams, A.G.; COLEMAN, G.S. *The Rumen Protozoa*. London: Springer-Verlag, New York Inc, 423 p. 1992.
- Ziguer, E. A.; Roll, V. F. B.; Bermudes, R. F.; Montagner, P.; Pfeiter, L. F. M; Pino, F. A. B. D.; Corrêa, M. N.; Dionello, N. J. L. Performance and metabolic pattern of feedlot lambs using soyabean hulls associated to different non-protein nitrogen sources | Desempenho e perfil metabólico de cordeiros confinados utilizando casca de soja associada a diferentes fontes de nitrogênio não-. *Rev. Bras. de Zootecnia*, v. 41, n. 2, p. 449-456, 2012.

