



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS “PROF.^a CINOBELINA ELVAS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**METIONINA MICROPARTICULADA EM MATRIZ LIPÍDICA
DE CERA DE CARNAÚBA (*Copernicia prunifera*)**

JOSÉ PIRES DE CARVALHO NETO

BOM JESUS – PI

2018

JOSÉ PIRES DE CARVALHO NETO

**METIONINA MICROPARTICULADA EM MATRIZ LIPÍDICA
DE CERA DE CARNAÚBA (*Copernicia prunifera*)**

Orientador: Prof. Dr. Leilson Rocha Bezerra

Co-orientador: Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

Dissertação apresentada ao *Campus* Prof.^a Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na Área de Concentração: Produção Animal (Linha de Pesquisa: Nutrição e Produção de Alimentos), para obtenção do título de mestre.

BOM JESUS – PIAUÍ

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI
CAMPUS“PROF.^a CINOBELINA ELVAS”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Metionina Microparticulada em Matriz Lipídica de Cera de Carnaúba
(*Copernicia prunifera*)

Autor: José Pires de Carvalho Neto

Orientador: Prof. Dr. Leilson Rocha Bezerra

Co-orientador: Dr. Edson Cavalcanti da Silva Filho

Aprovado em: 20/07/2018

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Leilson Rocha Bezerra

Centro de Saúde e Tecnologia Rural/PATOS/PB

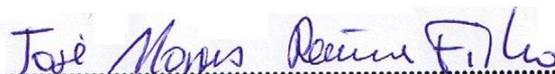
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE



Prof. Dr. André Leandro da Silva

Centro de Saúde e Tecnologia Rural/PATOS/PB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINAS GRANDE



Prof. Dr. José Morais Pereira Filho

Centro de Saúde e Tecnologia Rural/PATOS/PB

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Bom Jesus – PI

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho á minha família e aos meus colegas que sempre estiveram ao meu lado durante esse tempo de muita batalha. Esta dedicatória estende-se aos meus professores em especial ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, que sem dúvida está acima de tudo, por ter concebido a graça da realização deste sonho.

A toda a minha família, pelo apoio, carinho, paciência e amor que estiveram comigo durante toda esta batalha árdua.

À minha mãe Aldina e ao meu pai Josimar Pires, que souberam me guiar pelos caminhos certos e sempre estiveram ao meu lado nas alegrias e nas tristezas.

À minha irmã Mayara Pires que esteve sempre ao meu lado, sobretudo nos momentos difíceis.

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Leilson Rocha Bezerra** por acreditar no meu potencial, inserindo-me no grupo de pesquisa de Nutrição em Animais Ruminantes, dando-me oportunidade de cursar o mestrado, contribuindo para meu crescimento profissional, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, compreensão, respeito e acima de tudo sinceridade durante todo mestrado.

Ao prof. Dr. André pelo carinho, encorajamento e por seu espírito de abnegação e sacrifício, sem o qual não teria conseguido chegar ao final

Aos discentes Suyane, Lucas e Raphael pela paciência e dedicação e os dias de muitas dificuldades.

Aos mestrandos Raquel Vieira e Tobias Tobit pela paciência, ajuda e disponibilidade quando precisei.

A Universidade Federal do Piauí – UFPI, na qual obtive a oportunidade de conseguir alcançar meus objetivos.

EPÍGRAFE

Tudo é uma questão de escolha

Biografia do autor

José Pires de Carvalho Neto, filho de Josimar Ferreira Pires e Aldina da Conceição Amorim, nasceu na cidade de Bom Jesus, no dia 12 de julho de 1991, morando no município de Alvorada do Gurgueia até o ano de 2000, retornando a Bom Jesus para dar continuidade nos estudos.

Em agosto de 2010 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas e em julho de 2015 recebeu o Título de Médico Veterinário.

Em março de 2016 iniciou o Mestrado no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de Produção Animal, na Universidade Federal do Piauí, Campus Professora Cinobelina Elvas tendo como orientador o Prof. Dr. Leilson Rocha Bezerra.

No dia 20 de julho de 2018 defendeu a dissertação de mestrado intitulada: Metionina Microparticulada em Matriz Lipídica de Cera de Carnaúba (*Copernicia prunifera*)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO GERAL.....	XIII
ABSTRACT GERAL.....	IV
INTRODUÇÃO GERAL.....	15
CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1. Exigência de aminoácidos para os ruminantes.....	18
2. Uso de Aminoácidos Protegidos – Proteína Bay pass.....	20
3. Utilização da Metionina na produção animal.....	21
4. Processo de Microencapsulação e materiais encapsulantes.....	23
5. A Cera de Carnaúba.....	27
6. Cera de carnaúba como Agente encapsulante.....	28
7. Referências	30
CAPÍTULO II CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA BYPASS A PARTIR DA METIONINA MICROENCAPSULADA EM CERA DE CARNAÚBA.....	37
RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1. Preparo dos sistemas microencapsulados.....	40
2.2. Avaliação dos sistemas microencapsulados.....	41
2.2.1 Rendimento da microencapsulação.....	41
2.2.2 Eficiência de microencapsulação.....	41
2.3. Caracterização dos sistemas microencapsulados.....	41
2.3.1. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	41
2.3.2. Termogravimetria (TG)	42
2.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	42
2.3.4. Determinação da Carga.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

4. CONCLUSÃO.....	49
5. REFERÊNCIAS.....	49
CAPÍTULO III DEGRADABILIDADE <i>IN SITU</i> DE METIONINA	
MICROENCAPSULADA EM MATRIZ DE CERA DE CARNAÚBA.....	51
RESUMO.....	52
ABSTRACT.....	52
1. INTRODUÇÃO.....	53
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
2.1. Local do experimento	54
2.2. Formulação da metionina microencapsulada.....	54
2.3. Animais e manejos.....	55
2.4. Degradabilidade <i>in situ</i> da matéria seca e proteína bruta.....	56
2.5. Avaliação e perfil do nitrogênio do microencapsulado antes a após a cinética de degradabilidade e análise microscópica do tempo 72 horas após incubação.....	57
2.6. Análise estatísticas	58
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
3.1. Degradabilidade <i>in situ</i>	59
3.2. Perfil de liberação de nitrogênio.....	61
3.3. Avaliação da ocorrência de biodegradação por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	64
4. CONCLUSÃO.....	65
5. REFERÊNCIAS.....	65
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO II

Tabela 1. Quantificação do nitrogênio total, proteína bruta, teor teórico da metionina, e eficiência da encapsulação.....44

Tabela 2 – Dados extraídos das curvas termogravimétricas.....47

LISTA DE TABELAS DO CAPÍTULO III

Tabela 1 – composição da dieta fornecida aos animais durante o experimento.....56

Tabela 2- Estimativas da fração solúvel inicial (a), fração insolúvel potencialmente degradável (b), fração indigerível (c), fração potencialmente indegradada (i), degradação efetiva (DE) e degradação potencial (DP) da matéria seca59

Tabela 3- Degradabilidade potencial da matéria seca da metionina livre e das duas formulações 2:1 e 4:1 nos respectivos tempos (% H).....61

Tabela 4 – Estimativas da fração solúvel inicial (a), fração insolúvel potencialmente degradável (b), fração indigerível (c), fração potencialmente indegradada (i), degradação efetiva (DE) e degradação potencial (DP) da proteína bruta.....62

Tabela 5 - Parâmetros cinéticos de degradabilidade potencial da proteína bruta (PB) das duas proporções 2:1 e 4:1 nos respectivos tempos (% H).....62

LISTA DE FIGURAS DO CAÍTULO II

Figura – 1. Rendimento de microencapsulação da metionina em matriz de cera de carnaúba nas formulações de 4:1 e 2:1.	43
Figura 2 – micrografia eletrônica de varredura. A) matriz lipídica de cera de carnaúba B) metionina livre.....	44
Figura 3 – a) sistema microencapsulado prop_2:1 (33,3% de metionina). b) sistema microencapsulado prop_4:1 (20% de metionina).....	45
Figura 4 – curvas termogravimétricas TG, metionina, cera de carnaúba, e as formulações 2:1 e 4:1.....	46
Figura 5 – Curvas de DSC, da Metionina livre, Cera de carnaúba e das duas formulações 2:1 (33,3% de metionina) e 4:1 (20% de metionina).....	48

LISTA DE FIGURAS DO CAÍTULO III

Figura 1 – degradabilidade potencial (DP) dos produtos avaliados em função do tempo de permanência do rúmen (h) (cera pura, metionina livre, prop_2:1 e prop_4:1)	61
Figura 2- perfil de liberação do nitrogênio dos dois sistemas microencapsulados, prop_2:1 e prop_4:1, em função do tempo.....	63
Figura 3 – micrografia da prop_2:1 obtida antes (A), e após o teste <i>in situ</i> (B).....	64
Figura 4 – micrografia da prop_4:1 obtida antes (A), e após o teste <i>in situ</i> (B).....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

HAP - homogeneização à alta pressão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

TG - Termogravimetria

DSC - Calorimetria exploratória diferencial

Prop_2:1 – sistema microencapsulado com 33,3% de proporção de metionina

Prop_4:1 - sistema microencapsulado com 20% de proporção de metionina

RM – Rendimento de Microencapsulação

EM- Eficiência de Microencapsulação

DE – Degradabilidade Efetiva

DP – Degradabilidade Potencial

MS – Matéria Seca

PB – Proteína Bruta

RESUMO GERAL

CARVALHO NETO, J. P. **Metionina Microparticulada em Matriz Lipídica de Cera de Carnaúba (*Copernicia prunifera*)**. 2018 (68p). Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus, 2018.

A metionina é um dos principais aminoácidos componente das proteínas dos seres vivos vertebrados. A partir dela, são sintetizados mais dois aminoácidos, a cisteína, e a creatina, e as três exercem papel importante na formação da principal proteína que atende os requerimentos dos animais ruminantes, a proteína microbiana. Nesse estudo, objetivou-se microencapsular metionina em matriz lipídica de cera de carnaúba, através do método de *Melt emulsification*, protegendo o aminoácido da degradação ruminal, e tornando-o ele disponível para o uso diretamente no intestino, o que é denominado proteína *bypass*. Para isso, buscou-se avaliar e caracterizar a eficiência da metionina microencapsulada, em duas formulações 2:1 e 4:1 (Proporção cera de carnaúba:metionina). O método utilizado para proteger a metionina apresentou resultado satisfatório quanto ao seu rendimento, 82,3% e 78,5% para as formulações 2:1 e 4:1, respectivamente, sendo o primeiro com maior aproveitamento devido á quantidade menor de cera na formulação. A eficiência de microencapsulação baseada na determinação da carga obteve-se resultados satisfatórios, para os dois sistemas, evidenciado o potencial promitente da metionina protegida pela cera, matéria-prima regional de fácil aquisição. A cinética de degradação *in situ* demonstrou uma alta eficácia na proteção da metionina, para os dois sistemas estudados. No teste de degradação *in situ*, os sistemas microencapsulados 2:1 e 4:1 apresentaram no tempo 72 horas, teores remanescentes de metionina correspondentes a 83,2 e 88,7%, respectivamente, ressaltando a capacidade da cera de carnaúba de proteger a metionina frente ao ambiente ruminal. O perfil de liberação de nitrogênio no tempo 72 horas, mostrou uma proteção do núcleo de 91,0% na formulação 2:1 e 95,8% para a 4:1. Na microscopia eletrônica de varredura não se observou ataques por microrganismos ruminais e as micrografias após teste *in situ* não apresentaram sinais de erosões sofridas pelos microrganismos ruminais, mantendo assim sua integridade, reforçado a justificativa de que a cera é um produto que protege eficientemente a metionina da ação bacteriana. Portanto, a cera de carnaúba é um microencapsulante promissor e com alta capacidade de proteção de aminoácidos da ação de microrganismos ruminais, sendo a formulação 4:1 mais favorável à disponibilidade de proteína *bypass*.

Palavras-chave: degradabilidade ruminal, emulsificação, proteína *bypass*

ABSTRACT

CARVALHO NETO, J. P. **Microparticulate Methionine in Carnauba Wax Lipid Matrix (Copernicia prunifera)**. 2018 (70p). Dissertation (Master in Animal Science) - Federal University of Piauí, Bom Jesus, 2018.

Methionine is one of the major amino acid component of vertebrate living proteins. From it, two more amino acids, cysteine, and creatine, are synthesized, and all three play an important role in the formation of the major protein that meets the requirements of ruminant animals, the microbial protein. In this study, microencapsular methionine was used in the lipid matrix of carnauba wax, using the Melt emulsification method, protecting the amino acid from ruminal degradation, and made it available for use directly in the intestine, which is called the bypass protein. For this, the efficiency of microencapsulated methionine was evaluated in two formulations 2: 1 and 4: 1 (Carnauba wax: methionine ratio). The method used to protect methionine presented satisfactory results, 82.3% and 78.5% for the formulations 2: 1 and 4: 1, respectively, the first one being the most favored due to the smaller amount of wax in the formulation. The efficiency of microencapsulation based on the determination of the load obtained satisfactory results for the two systems, evidencing the promising potential of the methionine protected by the wax, regional raw material of easy acquisition. The kinetics of in situ degradation demonstrated a high efficacy in methionine protection for the two systems studied. In the in situ degradation test, the 2: 1 and 4: 1 microencapsulated systems showed in the 72 hours, remaining methionine contents corresponding to 83.2 and 88.7%, respectively, emphasizing the ability of the carnauba wax to protect the methionine compared to the ruminal environment. The nitrogen release profile at 72 hours showed a core protection of 91.0% in the 2: 1 formulation and 95.8% for the 4: 1 formulation. Scanning electron microscopy showed no attack by ruminal microorganisms and the micrographs after in situ testing showed no signs of erosion by ruminal microorganisms, thus maintaining its integrity, reinforcing the justification that wax is a product that efficiently protects methionine from bacterial action. Therefore, carnauba wax is a promising microencapsulant with a high capacity of protection of amino acids from the action of ruminal microorganisms, the 4: 1 formulation being more favorable to the availability of bypass protein

Keywords: ruminal degradability, emulsification, bypass protein

INTRODUÇÃO GERAL

Os aminoácidos constituem elementos essenciais na nutrição dos animais domésticos ruminantes, destinados à produção, sendo grande maioria desses elementos essenciais na dieta animal, desta forma a deficiência dos aminoácidos pode trazer consigo redução do desempenho produtivo e reprodutivos dos animais, causando grandes perdas econômicas, porém o seu excesso pode levar ao desequilíbrio nutricional.

A proteína é composta de 20 aminoácidos principais, sendo que normalmente dez são considerados como essenciais ou indispensáveis, necessitando, fazer parte na dieta. Os ruminantes precisam em sua dieta de aminoácidos para as atividades de síntese de proteína em diversos tecidos para a produção de leite e carne. Também podem ser necessários para maximizar a eficácia do crescimento microbiano no rúmen.

A quantidade e qualidade dos aminoácidos que chegam ao intestino delgado dos ruminantes procedem daqueles oriundos da fração proteica alimentar não degradada no rúmen e parecem ter perfil variável. Por outro lado, os aminoácidos não essenciais são sintetizados pelos tecidos em quantidades que atendem à exigência do metabolismo a partir de fontes de carbono e grupos de outros aminoácidos ou de compostos mais simples, eles não necessitam constar na dieta. Porém cabe ressaltar que todos os aminoácidos são indispensáveis para o organismo tanto os essenciais como os não essenciais.

Entre estes aminoácidos, os principais são os sulfurados (metionina, cistina e cisteína), sendo o primeiro precursor dos demais. No entanto, a proteína microbiana sintetizada pelos microrganismos ruminais atende em torno de 75% apenas da exigência proteica dos ruminantes, o que em regra não supre a quantidade total de aminoácidos para atender o requerimento de vacas leiteiras de alta produção, no geral é preciso de 2,4% de metionina na proteína metabolizável (NRC, 2011). Dessa forma, há a necessidade que parte desta proteína escape da degradação ruminal e chegue até o intestino delgado (duodeno) fornecendo assim a proteína não degradada no rúmen, também conhecida como proteína *bypass*.

De acordo a NRC (2001), a metionina é um aminoácido essencial, ou seja, o principal aminoácido limitante na produção animal. Diante disso a metionina foi o primeiro aminoácido a ser protegido na dieta dos ruminantes, uma vez que foi observado que a quantidade de metionina na dieta difere da quantidade que chegava ao intestino delgado para absorção (SUN et al, 2007).

As primeiras tentativas de proteger metionina foi usando os lipídeos, minerais e os carboidratos, inicialmente no Canadá na década de 1960, testaram a primeira metionina

protegida através de um composto à base de triestearina, a Noruega também foi pioneira protegendo o aminoácido com cerca de 30% de metionina disponível, a partir de então foram testados vários produtos na busca de proteger e conduzi-la até o intestino delgado (SCHWAB et al. 2001).

Portanto, sabe-se que a metionina no rúmen sofre o processo de desaminação sendo utilizada pelos microrganismos ruminais, tornando a quantidade inserida na dieta, bem diferente da que chega ao intestino delgado, sendo uma desvantagem a utilização desse aminoácido junto a dieta, de forma livre (Santos, 2006).

Dessa forma, a cera de carnaúba torna-se um produto que pode exercer um papel protetor destes aminoácidos livrando-o da degradação no rúmen, por apresentar característica hidrofóbica, além de ser um produto natural de baixa ou nenhuma degradabilidade, devido à sua composição química em ácidos graxos, além de ser de fácil aquisição. É um produto natural da região Nordeste do Brasil, mais especificamente nos estados do Piauí, Rio Grande do Norte e Ceará, é extraído das folhas das carnaubeiras (*Copernicia prunifera*).

Mediante o exposto, objetivou-se elaborar duas formulações de metionina microencapsulada em matriz lipídica de cera de carnaúba, avaliar o rendimento e eficiência da microencapsulação, a caracterização por técnicas de microscopia eletrônica de varredura, calorimetria exploratória diferencial, termogravimetria, além da avaliação do perfil de degradabilidade do material microencapsulado mediante o teste *in situ* em ovinos. Diante da conjectura buscou-se proteger a metionina através do processo de microencapsulação com matriz lipídica de cera de carnaúba, pelo método de fusão-emulsificação (*Melt emulsification*).

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1. Exigência de aminoácidos para os ruminantes

Os ruminantes possuem uma exigência metabólica por proteína bruta ou nitrogênio não proteico, sendo a cadeia de aminoácidos que compõe a proteína fundamental no processo, uma vez que as células do tecido animal precisam dos aminoácidos para desenvolver seu metabolismo, diante disso devem estar disponíveis em quantidade suficiente para os tecidos em quantidades e proporções adequadas para sua eficiência produtiva (Santos, 2006).

Os estudos sobre a exigência de aminoácidos na produção de leite ainda são limitados, entretanto quantidade insuficiente de aminoácidos essenciais disponível no duodeno limita a produção de leite, além disso limita a quantidade de proteína no leite, portanto o maior benefício de melhorar a quantidade de aminoácidos disponível no duodeno é aumentar a síntese de proteína no leite (Socha et al., 2008).

Sabe-se que a metionina é um aminoácido que sempre está incluso nos grupos dos principais aminoácidos limitantes, seguido por lisina, histidina e fenilalanina (Kamalak et al., 2005). No entanto na nutrição é necessário que sejam quantificados os aminoácidos essenciais que chegam ao duodeno. A proteína metabolizável juntamente com o fluxo de aminoácidos essenciais que chega ao duodeno são calculado a partir do conhecimento da composição dos aminoácidos essenciais, advindos da proteína duodenal, do total do fluxo de cada aminoácido essencial presente nas frações das proteínas metabolizáveis, do coeficiente da digestibilidade levando em consideração a proteína microbiana, isso para a fração não degradada e para proteína endógena e por fim, do fluxo de proteína metabolizável (NRC, 2001).

De acordo com Clark (1975), em vacas de alta produção, a proteína da dieta que escapa dos microrganismos ruminais contribui de 30 a 50% da proteína total que chega ao intestino delgado e se torna disponível. Porém, a quantidade de aminoácidos que escapam do rúmen não atende às exigências às quais os animais de alta produção necessitam, sendo, portanto, interessante buscar técnicas de transportar aminoácidos essenciais até o intestino delgado para serem absorvidos e utilizados pelo animal.

A metionina e a lisina são os aminoácidos essenciais na produção de leite, além da manutenção dos microrganismos ruminais, diante disso a NRC (2011) afirma que a suplementação com metionina pós-ruminal é uma saída para melhores índices de produção de leite, contudo estudos mostram que animais que recebem dieta pós-ruminal com metionina e lisina têm maior teor de proteína no leite.

A metionina é considerada o primeiro aminoácido limitante quando a dieta é à base de soja, e a lisina o primeiro quando a alimentação é à base de milho. (King et al., 1991; Polan et

al., 1991). Portanto no Brasil o milho e soja constituem os principais ingredientes presentes na alimentação dos ruminantes, desta forma a metionina e a lisina tornam-se os aminoácidos mais limitantes na produção animal.

O sistema digestório dos ruminantes é constituído por quatro cavidades gástricas que são denominadas rúmen, retículo, omaso e abomaso. Onde apenas esse último é considerado o estômago verdadeiro. Eles possuem uma diversidade enorme de microrganismo, os quais são responsáveis por realizar a fermentação do alimento. Vendo isso, vários tipos de bactérias são ativas na degradação da celulose, hemicelulose, lignina, amido, proteína e pouca quantidade de óleo (Acosta, 2012).

Essas bactérias são classificadas mediante a utilização de substratos ou características fermentativas comuns (Church,1993). Os alimentos fermentados dentro da cavidade vão reintegrando um alto valor nutricional de 20 e 60 g dos aminoácidos, lisina e metionina, respectivamente, buscando atingir os níveis de 6,92% de lisina e 2,34% metionina na proteína metabolizável, sugerido pelo *Cornell Net Carbohydrate and Protein System* (CNCPS).

Os ruminantes, ao ingerir os aminoácidos os utilizam para a síntese de proteína microbiana e para a manutenção dos microrganismos ruminais (Santos, 2006). A amônia é sintetizada no rúmen a partir do processo de deaminação no qual é utilizada como fonte de nitrogênio primário para o crescimento bacteriano e pode ser utilizada para a síntese de aminoácidos (Chalupa, 1974). A amônia não utilizada é difundida para fora da célula e é absorvida através da parede ruminal para ser convertida em ureia pelo fígado (Leonardi, 2001).

Os microrganismos têm grande capacidade em degradar proteínas (atividade proteolítica), porém uma quantidade de proteína pode escapar da ação deles e chegar até o abomaso. Diante disso quantificar a proteína na dieta da degradação ruminal é um processo trabalhoso, isso devido à dificuldade de distinguir entre a proteína microbiana do rúmen, abomaso ou da digestão intestinal, sendo assim, a quantidade de proteína e aminoácidos que escapam da degradação ruminal variam grandemente entre diferentes alimentos, dependendo da sua solubilidade e da sua taxa de passagem para o intestino delgado (Kamalak et al., 2005).

Pouca quantidade de aminoácidos livres no rúmen é uma hipótese da rápida degradação do composto, os peptídeos e aminoácidos advindos da degradação ruminal da proteína e não incorporados nas células microbianas podem seguir para o duodeno e serem absorvidos pelos ruminantes, as proteínas incorporadas às células microbianas originam a proteína microbiana que supre parte da exigência proteica do ruminante (Santos, 2006).

2. Uso de aminoácidos protegidos (proteína *Bypass*) na nutrição animal

Nos animais monogástricos a deficiência de qualquer aminoácido, pode ser corrigida pela simples adição individual do limitante, e rapidamente será corrigido, entretanto nos ruminantes é bem mais complexo quando é necessário balancear a ração para suprir os nutrientes faltosos, isso porque a capacidade dos mesmos em degradar as forragens baseado na presença de microrganismo no rúmen-retículo (Lapierre et al., 2006).

Ainda segundo Lapierre et al., (2006) quando os aminoácidos são disponibilizados na dieta os mesmos são degradados e utilizados pelos microrganismos, ou seja, a metionina e a lisina são rapidamente degradadas no rúmen, o que inviabiliza a simples adição deles na dieta não significando que estarão disponíveis no duodeno.

De acordo Leonardi (2001), 60% dos aminoácidos são absorvidos na porção do jejuno, e os outro 40% no íleo, no entanto para que eles consigam chegar ao duodeno é preciso serem infundidos diretamente nesta região ou serem protegidos da degradação ruminal.

Contudo, é preciso métodos que protejam os aminoácidos da ação das bactérias, tornando assim, maior aproveitamento dos aminoácidos pelo tecido animal, a eficácia do uso da metionina e da lisina dependerá da quantidade desses que chegarão ao duodeno (Socha et al, 2005; Lapierre et al., 2006).

O objetivo de proteger o aminoácido (proteína *bypass*) é aumentar o fornecimento deste para a absorção e conseqüentemente aumentar a produção animal, além de reduzir a perda de nitrogênio na urina. Alguns procedimentos são usados para proteger os aminoácidos como: tratamento com calor, tratamento/modificação química, inibição da atividade proteolítica e identificação de proteínas naturalmente protegidas, as gorduras e ceras naturais são os principais compostos utilizados para proteger os aminoácidos, uma vez que, são praticamente inertes ao ataque dos microrganismos (Kamalak et al., 2005)

A metionina é o principal aminoácido protegido da degradação ruminal, por métodos mecânicos e químicos na década de 90 as principais formas de proteção para evitar a fermentação era através de manipulação de aminoácidos análogos e proteção com materiais resistentes (Chalupa et al., 1996). A partir do século XXI, começou-se a estudar o encapsulamento com compostos poliméricos resistentes à degradação ruminal (Alves, 2004).

Em pesquisa, Leonardi (2001) constatou que a adição de lisina e metionina resultou em aumento de produção e percentual de proteína do leite isso quando comparado ao grupo controle. Metionina e lisina aumentaram 0,08 unidades percentuais e 40 g/dia de proteína do leite, comparado ao grupo controle. Ainda segundo Socha et al., (2005) também forneceram

lisina e metionina protegidas em dietas com percentual de proteína bruta variável (16 e 18,5%). Observaram nos resultados que o percentual de proteína bruta e o fornecimento de aminoácidos protegidos apresentaram respostas variadas de acordo com o estágio da lactação, sendo que aumentou o teor de proteína no leite, explicado que esse aumento ocorreu devido à maior disponibilidade de metionina na glândula mamária para síntese proteica.

De acordo Lee et al., (2012), é um desafio identificar a quantidade exata de aminoácidos protegidos na dieta, isso porque existem fatores que afetam as necessidades da proteína *bypass* como por exemplo a proteína microbiana, a digestibilidade da proteína *bypass* e as concentrações de metionina.

Desta forma, Cabrita et.al (2011), observaram que vacas alimentadas com dietas com maior teor de proteína *bypass*, produziram mais leite e com mais nutrientes, em comparação com vacas alimentadas com teores mais baixos de proteína protegida. Segundo Broderick (2015), a proteína *bypass*, em substituição a silagem de milho e silagem de luzerna e milho, aumentou a produção de leite e da proteína do leite, comprovando a eficácia da proteína protegida no rúmen.

Paz et al (2013), observou um aumento na produção de leite e da proteína do leite em vacas alimentadas à base de silagem de milho, silagem de luzerna, feno, semente de algodão e soja, no qual a soja foi substituída parcialmente por proteína *bypass*, ou seja, mesmo em uma dieta com alto valor nutricional a proteína protegida aumenta a produção de leite.

3. Utilização da metionina na produção animal

A metionina juntamente com a lisina são considerados os principais aminoácidos limitantes para a produção e a síntese de proteína do leite de vacas de alta produção (NRC, 2001). A metionina é um aminoácido codificado, sendo, portanto, um dos componentes das proteínas dos seres vivos, com exceção das bactérias procariontes. Ele é precursor de outro aminoácido, a cisteína, e da creatina. Por ser essencial, a metionina não é sintetizada no organismo do animal ou não o são em quantidade suficiente, por isso recebem a denominação de aminoácidos essenciais (Santos, 2006).

Ainda de acordo Santos (2006) eles precisam ser ingeridos, por isso é tão importante supri-los na dieta. O ruminante tem uma exigência real que é por aminoácidos (AAs) e não proteína simplesmente. Além da determinação das exigências de AAs, torna-se imprescindível também o conhecimento da degradabilidade ruminal e da digestibilidade da proteína bruta no intestino delgado, além do conhecimento da eficiência de síntese microbiana.

A metionina é aminoácido bastante utilizado, já que ela apresenta ampla função metabólica no organismo dos animais. Esse fato, quando associado à sua importância zootécnica possui um alto grau de importância, já que a deficiência dela é conhecida por causar prejuízos renais e hepáticos. São também importantes no metabolismo da gordura do fígado evitando a síndrome do fígado gorduroso (Frota, 2014).

Além de regular os níveis plasmáticos da homocisteína, uma vez que este aminoácido sulfurado, quando em alta concentração, tem relação direta com a doença cardiovascular tais como infarto agudo do miocárdio, a trombose e aterosclerose. Também tem uma atuação na eliminação das impurezas, o promovendo criação de tecidos mais saudáveis. Este aminoácido que também contém enxofre, serve como fonte até mesmo para a cisteína tanto em animais como seres humanos (Schwab, 2010).

Considerando as exigências dos animais em relação à presença de aminoácidos em seus alimentos, verifica-se que o conceito de essencialidade apresenta uma certa elasticidade, já que é sempre necessário incluir nas rações tanto os aminoácidos essenciais quanto os não essenciais. O uso da metionina nas rações vem para suplementar o que o animal necessita para se manter e para conseguir produzir os seus produtos, além de inúmeros benefícios que ocorrem no animal (Lana, 2005).

Na prática da alimentação, observa-se, que as misturas de alimentos apresentam valor biológico mais alto que os alimentos isoladamente, já que existe uma combinação que pode resultar em proteínas completas de alto valor biológico. Outro aspecto, é que os microrganismos são fonte de proteína natural para os ruminantes (Pacheco et al., 2012).

O alimento ingerido pelo animal proporciona um aporte constante de substratos que é retido por tempo e volume necessário para que os componentes da dieta sejam degradados e fermentados. A diferença no tempo de abandono do rúmen da fase líquida e das partículas possibilita uma fermentação eficaz, levando em consideração que existe uma combinação infinita de aminoácidos, portanto se faz importante um maior aproveitamento, para que nenhum aminoácido seja perdido (Whitehouse, 2013).

Alterações prósperas só são possíveis com a compreensão que existem diferentes formas nos sistemas de alimentação, onde o uso de metionina além de melhorias realizadas na fermentação ruminal podem ser demonstradas com princípios bem estabelecidos da ecologia microbiana (ocupação de nicho, pressão seletiva, adaptação e interações) envolve aumentar a produção de leite aumenta também a qualidade do leite. O ideal é suplementar a metionina para

que supra as necessidades do animal, onde associa-se o uso para exercer o mínimo de suas funções e que venha a produzir os seus produtos como leite e carne (Frota, 2014).

Ainda segundo Frota et al. (2014) aplicações destes princípios é sempre buscando propostas de modificações que diminuam os custos. Há um crescente interesse, pois, é economicamente viável, já que se tem um retorno bem satisfatório.

Bovinos de corte e de leite geneticamente selecionados para altas produções são alimentados com dietas de alta energia em sistemas de produções intensivos. Este tipo de alimentação pode induzir deficiências orgânicas no rúmen que têm que ser corrigidas para melhoria da relação custo-benefício. A principal característica da utilização da metionina na produção de carne foi a melhoria da qualidade da carne, afirma o trabalho (Broderick et., al 2008).

A partir do século XX, principalmente em função da mudança de hábitos alimentares e do estilo de vida da população a incidência de doenças cardiovasculares passou a assumir maior importância, por ter um grande número de óbitos decorrentes disso. Este fato está atribuído ao elevado consumo de gorduras, em especial de origem animal, por aumentarem os níveis de colesterol sanguíneo. O uso da metionina tem bastante importância na saúde humana olhando por esse lado da produção de carne, pois possibilita uma carne de maior qualidade na mesa dos consumidores, pois se altera a forma que os ácidos graxos fornecidos aos animais e o tipo da gordura, são depositados nos tecidos ou no leite (Alves, 2004).

4. Microencapsulação e materiais encapsulantes

A encapsulação na produção de alimentos é definida como um processo pelo qual um ou mais ingredientes (constituente do núcleo) são recobertos por uma cápsula comestível, inerte à saúde (Azaredo, 2005).

Segundo Favaro-Trindade et al., (2008), a microencapsulação consiste em envolver materiais sólidos, líquidos e gasosos em cápsulas pequenas, pelo qual será liberada de forma controlada, sob as condições desejadas, protegendo de alguma ação sofrida antes do seu destino. É uma tecnologia promissora, sendo empregada com sucesso na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética.

O composto encapsulado é definido como núcleo ou recheio, e o material que forma a capa protetora é conhecida como parede ou cobertura. Além disso a cápsula é classificada de acordo com o tamanho da partícula, sendo macro- (5000µm), micro- (0,2-000 µm) e nanocápsulas (<0,2 µm) (Azaredo, 2005).

O objetivo de encapsular os compostos são: reduzir as interações do núcleo (material encapsulado) com fatores ambientais, físicos, químicos e biológicos. Com isso retardando as alterações que poderão sofrer, como perda da cor, aroma e principalmente o valor nutricional, além de diminuir a saída do núcleo para o ambiente externo, evitar reações indesejadas, mascarar os sabores, obter melhor solubilização do núcleo, outros objetivos importantes da microencapsulação é a liberação controlada e a proteção de aminoácidos da ação biológica de microrganismo (Risch, 1995).

Existem vários tipos de microencapsulação, no entanto a escolha do método para uma determinada aplicação dependerá de uma série de fatores, que devem ser avaliados antes do processo, como: propriedades físicas e químicas tanto do núcleo quanto da parede, tamanho da partícula requerido, aplicação do produto final, forma de liberação desejada, além da escala de produção e os custos (Ré, 1998).

Segundo Madene et al. (2006), tem-se vários métodos para microencapsular dentre eles pode-se destacar os seguintes. Físicos: extrusão centrífuga, liofilização, extrusão estacionária, *spray-chilling e spray-cooling*, leite fluidizado, co-cristalização, atomização, bocal submerso, *pan coating*, suspensão por ar, disco rotativo, e bocal vibrante. Químico: polimerização, indução molecular e polimerização interfacial e os Físico/químicos: coacervação complexa, coacervação simples evaporação do solvente lipossomas, lipoesferas (nanopartículas) e Fusão-Emulsificação (*Melt emulsification*).

O método de Fusão-Emulsificação consiste na fusão prévia de lipídios, sendo incorporado o princípio ativo (núcleo), por meio de dissolução ou por dispersão. Em busca de estabilizar a emulsão pode-se adicionar fosfatidilcolina ao lipídio fundido, logo após essa fase a emulsão entra em fase aquosa, na qual tem-se um tensoativo do tipo O/A como, por exemplo, um polissorbato, (Yoo, 2010) ou um polaxamer (Kheradmandnia, 2010).

Após essas fases, a emulsão é mantida em temperatura ambiente, para que ocorra a solidificação do composto, além da obtenção da dispersão aquosa do microencapsulado (Siddiqui, 2010).

Segundo Hu (2010); Yang (2009), o método de emulsificação do lipídio fundido com a fase aquosa faz-se uso de agitação mecânica ou de ultrassons, além disso pode-se ainda proceder-se, adicionalmente, a uma operação complementar de homogeneização à alta pressão (HAP). No entanto estes procedimentos provocam a ruptura das gotículas lipídicas de maiores dimensões, originando gotículas pequenas, dispersas no meio da fase aquosa (Attama, 2009).

O processo se inicia com a fusão da cera e incorporação do agente a ser encapsulado, seguida da fase de resfriamento para então formar o microencapsulado (Shegokar, 2011). Cabe destacar o uso do tensoativo, isso porque sua concentração são fatores que influenciam diretamente as características do microencapsulado, designadamente as suas dimensões, a retenção do princípio ativo e a eficiência de encapsulação (Bunjes, 2003). Os mais usados no processo de microencapsulação a quente são os fosfolipídeos (como a fosfatidilcolina) e um estabilizante estereoquímico (por exemplo, um polaxamer) na fase aquosa externa, além do Tween 80, usado para a emulsão de cera naturais (Yassin, 2010).

A temperatura é importante, pois os lipídios e as ceras naturais têm pontos de fusão diferentes, e quando elevadas conduzem a uma diminuição do tamanho das partículas, uma vez que promovem uma diminuição da viscosidade da fase interna, originando também uma distribuição mais homogênea de tamanhos, portanto para iniciar a recristalização do lipídio ou ceras, é necessário resfriar a uma temperatura que depende da natureza do encapsulante (Varia, 2008).

Estudos mostram diferentes tipos de agente usados para microencapsular, porém a escolha do agente para proteger o composto deve levar em consideração vários fatores, dentre eles os mais importantes são as propriedades físicas e químicas do núcleo, (solubilidade e porosidade), a parede (propriedades mecânicas, viscosidade, capacidade de formar os filmes), a compatibilidade do núcleo com o agente encapsulante, mecanismo de controle, resistência e fator econômico (Brazel, 1999).

Em geral os carboidratos são os agentes mais utilizados como encapsulante, isso porque eles têm a capacidade de se ligar aos compostos além disso a diversidade e o baixo custo (Gouins, 2004).

O encapsulante dever conter ainda baixa hidrosopicidade, baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos (menor que 0,5 Pa. em concentrações superiores a 45%), fácil reconstituição boas propriedades de formação de filme, sabor e odor suaves e baixo custo. É importante ressaltar que dificilmente um composto apresenta todas essas características (Shahidi, 1993).

Segundo Jackson e Lee (1991), são vários os compostos que podem ser usados como proteção (microencapsulante), sendo eles: goma arábica, ágar, alginato e carragena; os carboidratos amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose, as celulosas carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose, os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis,

óleos e gorduras, os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos, as proteínas do glúten, caseína, gelatina, albumina e as ceras naturais.

Enfim, a escolha do agente encapsulante mais adequado influencia as propriedades físicas e químicas das micropartículas obtidas. Portanto, o material encapsulante deve ter a capacidade de formar uma película coesa com o material do núcleo. Esta capacidade exige compatibilidade química e física, proporcionando as propriedades desejadas, tais como flexibilidade, resistência, impermeabilidade e estabilidade na preparação (Venkatesan; Manavalan; Valliappan, 2009).

As ceras naturais constituem os compostos inovadores e promissores como agentes encapsulantes, apresentam várias características de um agente para encapsular, além de ser de fácil manuseio e baixo custo. Dentre elas a cera de carnaúba é um composto limpo de pureza alimentar e reconhecida como aditivo seguro para o uso na microencapsulação, já liberado em vários países do mundo (Milanovic et al., 2010).

O principal objetivo da microencapsulação é proteger o núcleo de possíveis agressões físicas, químicas ou biológicas, até que sua liberação seja desejada. Em todo o processo a etapa mais importante é a liberação no local e momento pretendido pelo estudo, ou seja, alcançando assim o objetivo da microencapsulação (Gouin, 2004).

Além disso cada processo de encapsulação tem sua forma de liberação do núcleo, ou seja, composto com sabor e nutrientes geralmente são liberados no momento do consumo, outros logo após o consumo (Gibbs, 1999).

No entanto segundo Gander, (1996), os principais fatores que afetam a liberação do núcleo, são exatamente a interação entre o material encapsulante e o núcleo. Porém além desta, outras variáveis também afetam esta disponibilidade como: tamanho das partículas, grau de viscosidade do polímero encapsulante, volatilidade do núcleo, proporção entre núcleo e encapsulante.

Em suma, o tipo de geometria das partículas do núcleo e, principalmente, do material encapsulante determinam o mecanismo de liberação. A maioria dos compostos usados como encapsulantes são carboidratos, tipicamente hidrofílicos e amorfos, capazes de formar uma estrutura vítrea por meio da remoção de água (Karen, 1998).

Em relação às ceras naturais, ou seja, os processos que utilizam encapsulantes hidrofílicos resultam geralmente em liberação mais rápida do núcleo, enquanto o uso de gorduras ou ceras como encapsulantes tende a retardar a liberação (Whorton, 1995).

5. A cera de carnaúba

A cera de carnaúba é um produto obtido a partir das folhas das palmeiras (*Copernicia prunifera*), que é uma planta nativa do Brasil, na qual é encontrada apenas nos estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte. O produto é extraído em forma de escamas duras e de cores diversas, de amarronzada a amarelo. O processo para obter o produto é em geral de maneira artesanal, obtido a partir das folhas das carnaubeiras, por meio de processo de bater as folhas até que as mesmas liberem a cera, em seguida ocorre o processo de refinamento da cera. (Carvalho, 2008).

A instrução normativa nº 35, de 30 de novembro de 2004, aprovou o regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação da cera de carnaúba, além de definir a mesma como: a cera de carnaúba é um produto obtido a partir do pó cerífero que reveste as células epidérmicas da folha da palmeira Carnaúba.

O produto extraído das folhas das carnaubeiras possui estrutura química complexa, sendo que os principais componentes da cera são éster de melissil ceronato em torno de 38-40%, em seguida o diésteres- p-idroxicinâmico alifático de 20 a 23%, ésteres Z-hidroxi-alifático (12-14%); álcoois mono-hídricos (10-12%); diésteres p metoxicinamato alifático (5-7%) e demais combinações de hidrocarbonetos (5-7%). Em suma tem-se um teor muito alto de ésteres, no qual são os principais componentes das estruturas da cera, chegando a 85%, (Vandenburg e Wilder, 1970).

Junior e Marques (2009) mostraram que a composição da cera advém de uma estrutura triacontanol, ou seja, em sua forma natural são os ésteres e seu processo de hidrólise é em forma de álcool. De maneira geral, mostrou-se que a cera apresenta 85% de ésteres de ácidos graxos, o restante composto por ácidos graxos e álcoois livres, além de resinas e hidrocarbonetos totalizando assim seus componentes químicos.

A *Copernicia prunifera* (carnaúba), possui aproveitamento total, os frutos são usados na alimentação humana, sendo um importante alimento de muitas famílias carentes da região nordeste, o tronco e as folhas é usada na construção civil e artesanatos, suas raízes usadas como princípios medicinais. Na construção civil usado principalmente em currais e coberturas de casas, (caibros, linhas e ripas), pois apresenta alta durabilidade e resistência ao sol e chuva, o tronco também são usado para construção de materiais ornamentais de uso diário e poste de eletricidade (Marques, 2012).

Ainda segundo Marques (2012), as folhas possuem maior interesse econômico, pois é delas onde é retirada a cera de carnaúba. Por ser uma planta da região onde tem grande incidência solar, a mesma apresenta em suas folhas uma cobertura cerífera na qual reflete a luz,

e tem por finalidade impedir que a planta perca água por transpiração, além de protegê-la contra os ataques de fungos.

A cera de carnaúba é conhecida como um sólido plástico, bem resistente, na qual é formada por uma mistura de massa molar de ésteres e hidroxiácidos bem complexa (Villalobos-Hernández et al., 2005).

A utilização da cera de carnaúba é bastante ampla, atualmente já é usada em: cera dental, produtos de tratamentos de pele e cabelos, e revestimentos de cápsulas, (microencapsulação de produtos), graxas de sapatos, fósforos, isolantes, tintas, esmaltes, vernizes, sabonetes, grafites, também é usada para tintas de impressora, cola, chips, lápis de cera e papel carbono. As folhas da carnaúba já são bastante usadas como adubos orgânicos, apresentando resultados satisfatórios, pois apresenta vários componentes fundamentais para o solo, além disso possui capacidade de retenção de água, mantendo o solo mais úmido em relação aos outros adubos comuns, tornando um excelente método a ser empregado na região nordeste do Brasil. Por fim a bagana da palha da carnaúba está sendo muito utilizada como alternativa na alimentação dos animais nos períodos de secas, sendo uma forma de maximizar a sazonalidade das chuvas apresentada na região do nordeste brasileiro (Gomes et al., 2009).

Além disso a cera é amplamente utilizada na conservação de frutas, a mesma é emulsionada com água, e aplicada sobre as frutas, na qual forma uma película que protege os frutos principalmente de oxidação, ou seja, da ação do oxigênio, com isso, evita que haja perda de água pela evaporação, conservando os frutos por mais tempo, a aplicação da cera de carnaúba em frutos como: tomates e mangas, maçãs, peras e bananas, podem prologar o tempo de viço, em torno de 50% a mais, em relação às que não receberam o produto (Carvalho, 2008).

6. Cera de carnaúba como agente encapsulante

A microencapsulação é um processo definido como uma matriz na qual envolve um núcleo sólido, líquido ou gasoso, buscando protegê-lo de condições adversas do meio onde será exposto, possíveis interações, ações de microrganismo, enzimas, dentre outras possibilidades que poderia o núcleo sofrer, aumentando a vida útil e a disponibilidade no local desejado do núcleo, desta forma, a eficácia da retenção do composto que foi encapsulado é regulada por suas adversidades físicas, químicas, polaridade, solubilização e volatilização (Gharsallaoui et al., 2007).

De acordo Silva et al., (2014), as micropartículas atuam como uma capa protetora, pela qual isola as substâncias ativas (nesse caso a cera isola e protege a metionina) evitando a exposição inadequada ao ambiente ruminal.

De acordo com Brasil (2007), a cera de carnaúba é reconhecida nacionalmente como produto seguro ao consumo humano. Além disso a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da resolução nº 123, de 19 de junho de 2001, liberou a adição da cera de carnaúba em embalagens de produtos no qual serão destinados ao contato ou consumo humano, sendo, portanto, segura também ao consumo animal.

Segundo Miranda (2015), a cera de carnaúba é um produto amplamente usado na formação de revestimentos convencionais e nanoestruturas, podendo ser estudada em diferentes formulações e concentrações, buscando aproveitar as diferentes propriedades térmicas, mecânicas, físicas e químicas presentes na cera, além disso a cera promove barreiras que atuam como antimicrobiano e fúngico, diante disso o revestimento apresentado pela cera de carnaúba é inerte à ação de microrganismo. Nesse sentido a microencapsulação tornou-se uma área de bastante estudo, sendo, portanto, uma ferramenta promissora no desenvolvimento de agentes de proteção para diferentes substâncias.

O processo de microencapsulação tornou-se um campo de estudo bastante difundido, em diversas áreas como: farmacêuticas, alimentícias, agrícola e cosméticos, objetivando conduzir o encapsulado até o local onde deverá ser liberado, geralmente o produto é protegido de degradações químicas e biológicas, mascarando possíveis propriedades indesejáveis e controlando sua liberação no local desejado (Gan et al., 2008).

Segundo Inácio (2017), a escolha do método para microencapsular mais adequado dependerá do agente a ser encapsulado (núcleo) de sua aplicação e do mecanismo de liberação desejado. Diante disso, a microencapsulação pode ser realizada de diversas formas, em destaques técnicas como: emulsificação, nanoemulsificação, liofilização, coacervação, cobertura por *spray* em leito fluidizado, extrusão, *spray chilling*, *spray cooling*, *spray drying*, nanoprecipitação, inclusão molecular e polimerização interfacial, co-cristalização, e envolvimento por lipossomas (Nedovic et al., 2011). Sendo, portanto, os métodos mais usados o *spray drying*, por coacervação, liofilização e emulsificação (KaushiK et al., 2015).

Desta maneira, encapsular está associado também às características do agente a ser encapsulado, os compostos mais usados são as proteínas, lipídios (gorduras), ceras, gomas, carboidratos e fibras (Gharsallaoui et al., 2007).

As ceras naturais como: de carnaúba, abelha e de candelilla, são compostos limpos, reconhecidos como aditivos seguros para o uso de microencapsulação, já liberado em vários países do mundo (Milanovic et al., 2010).

Ainda segundo Milanovic et al. (2010), a cera de carnaúba é entre as ceras naturais a mais satisfatória para os processos de microencapsular, apresenta alto ponto de fusão. Quando comparada com outras ceras, a mesma apresenta menos viscosidade, mais elasticidade e mais resistente a deformações e ataques de agentes biológicos.

Referências

- ACOSTA, E. S.; CERRILLA, M. E. O.; MARTÍNEZ, G. M.; VALDEZ, O. D. M.; DIOS, S. E. B. Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina protegida en dietas para ovinos em crecimiento. **Interciencia**. v. 37, n. 5, p. 395-399, 2012.
- ALVES, D. D. Nutrição aminoacídica de bovinos. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 3, p. 265-271, 2004.
- ANTONGIOVANNI, M; ACCIAIOLI, A.; FRANCI, O.; PONZETTA, M. P.; PUGLIESE, C.; BUCCIONI, A.; BADI, M. Field bean (*Vicia faba* var. minor) as a protein feed for growing lambs with and without protected lysine and methionine supplementation. **Italian Journal of Animal Science**, v. 1, n. 3, p. 229-238, 2002.
- BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.
- BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC n.º 123, de 19 de junho de 2001 – Aprova o Regulamento Técnico sobre Embalagens e Equipamentos Elastoméricos em Contato com Alimentos. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao Alimentos/Embalagens](http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/Embalagens)>. Acesso em: 22/05/2012.
- BRASIL. ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução – RDC n.º 2, de 15 de janeiro de 2007 – **Regulamento Técnico Sobre Aditivos Alimentares**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9a6775004745f218ac0de3fbc4c6735/C_2_2007.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 20/05/2012.
- BRAZEL, C.S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v. 44, n. 6. p.388-393, 1999.
- BRODERICK GA & REYNAL S, M. “Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows” **Journal of Dairy Science** 92, v. 92, n. 6, p. 2822-2834, 2009.

- BRODERICK, G. A., FACIOLA, A. P., ARMENTANO, L. E. “Replacing dietary soybean meal with canola meal improves production and efficiency of lactating dairy cows” **Journal of Dairy Science**. v. 98, n. 8, p. 5672-5687, 2015.
- BRODERICK, G.A; STEVENSON, M.J.; PATTON, R.A; LOBOS, N. E; COLMENERO, J. O. Effects of supplementing rúmen-protected methionine on production and nitrogen excretion in lactating dairy cows. **Journal. Dairy Science**. v. 91, p. 1092-1102, 2008.
- CARVALHO, F. P. A.; GOMES, J. M. A. Eco-eficiência na produção de cera de Carnaúba no município de Campo Maior, Piauí, 2004. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 46, n. 2, p. 421-453, 2008.
- CABRITA, A. R. J., DEWHURST, R. J., MELO, D. S. P., MOORBY, J. M., & FONSECA, A. J. M. “Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets” **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4647-4656, 2011.
- CHURCH, D.C. **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**. Zaragoza: Acríbia, 1993. 641p.
- CLARK, J. H. Lactation responses to postruminal administration of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, v.58, n. 8, p. 1178 – 1197, 1975.
- DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**. v.42, n.4, p.136-151, 1988.
- ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and -congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 47-54, 1991.
- FROTA, H. N. REIS, R.B. FARIA, B.N. COELHO, S.G. SATURNINO, H.M. Suplementação de lisina e metionina em associação ou não com o óleo de soja na dieta de vacas leiteiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, n.4, p.1121-1128, 2014.
- GAN, C.Y.; CHENG, L.H.; EASA, A. M. Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 9, n. 4, p. 563–569, 2008.
- GANDER, B. JOHANSEN, P.; NAM-TRÂN, H.; MERKLE, H,P. Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly(D,L-lactide) by spraydrying. **International Journal of Pharmaceutics.**, v.129, p.51–61, 1996.

- GHARSALLAOUI, A. ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.
- GIBBS, B.F.; KERMASHA. S.; ALII. I.; MULLIGAN. C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.50, p.213-224, 1999
- GOMES, J.A.F.; LEITE, E. R.; CAVALCANTE, A.C.R.; CÂNDIDO, M.J.D.; LEMPP, B.; BOMFIM, M.A.D.; ROGÉRIO, M.C.P. Resíduo agroindustrial da carnaúba como fonte de volumoso para a terminação de ovinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 58, 2009.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science e Technology.**, v.15, n.7-8, p.330-347, 2004.
- HU, L., XING, Q., MENG, J., & SHANG, C. Preparation and enhanced oral bioavailability of cryptotanshinone-loaded solid lipid nanoparticles. **Aaps Pharmscitech**, v. 11, n. 2, p. 582-587, 2010.
- INÁCIO, A. G. **Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de chia microencapsulado**. 2017. 51 p. dissertação (mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Campo Mourão, 2017.
- JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.
- JUNIOR. J A.M; MARQUES, L.G.A. **Cera de carnaúba**. Cadernos de Prospecção v. 2, n. 1 p. 36-38, 2009.
- KAMALAK, A.; CANBOLAT, O.; GÜRBÜZ, Y., ÖZAY, O. Protected protein and amino acids ruminant nutrition. **Journal Science and Engineering**, v.8, p.84-88, 2005.
- KAREL, M.; LANGER, R. Controlled release of food additives. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Flavor encapsulation**. Washington, DC: ACS, 1988. p.29-36.
- KAUSHIK, P., DOWLING, K., BARROW, C. J., & ADHIKARI, B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 868–881, 2015.
- KHERADMANDNIA, S., VASHEGHANI-FARAHANI, E., NOSRATI, M., & ATYABI, F. Preparation and characterization of ketoprofen-loaded solid lipid nanoparticles made from beeswax and carnauba wax. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 6, n. 6, p. 753-759, 2010.

- KING, K. J., BERGEN, W. G., SNIFFEN, C. J., GRANT, A. L., GRIEVE, D. B., KING, V. L., AMES, N. K. An assessment of absorbable lysine requirements in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v. 74, n. 8, p. 2530-2539, 1991.
- LANA, R.P. **Nutrição e alimentação animal**. 1 ed. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa. 2005, 343p.
- LAPIERRE, H., PACHECO, D., BERTHIAUME, R., OUELLET, D. R., SCHWAB, C. G., DUBREUIL, P., LOBLEY, G. E. What is the supply of amino acids for a dairy cow? *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. E1 – E14, 2006
- LEE, C., HRISTOV, A. N., CASSIDY, T. W., HEYLER, K. S., LAPIERRE, H., VARGA, G. A., PARYS, C. “Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet” *Journal of Dairy Science* v. 95, n. 10, p. 6042-6056, 2012.
- LEE, C., GIALLONGO, F., HRISTOV, A. N., LAPIERRE, H., CASSIDY, T. W., HEYLER, K. S., PARYS, C. “Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows” *Journal of Dairy Science*. v. 98, n. 3, p. 1885-1902, 2015.
- LEONARDI, C. **Effect of methionine supplementation on productive performance of dairy cattle**. 2001. 37f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) - University of Wisconsin, Madison.
- MADENE, A.; MURIEL, J.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, Oxford, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.
- MARQUES, J.S. **USO DO PÓ DA PALHA DE CARNAÚBA EM COMPÓSITOS DE QUITOSANA**. Dissertação (dissertação em Química), UFRN. Natal/RN, p. 74. 2012. Disponível em: [https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/17655/1/Jessica SMDISSERT.pdf](https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/17655/1/Jessica%20SMDISSERT.pdf). Acesso 28 de janeiro de 2018.
- MILANOVIC, J., MANOJLOVIC, V., LEVIC, S., RAJIC, N., NEDOVIC, V., & BUGARSKI, B. Microencapsulation of flavors in carnauba wax. *Sensors*, v. 10, n. 1, p. 901-912, 2010.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO - MAPA. **Regulamento técnico de identidade e de qualidade para a classificação da cera de carnaúba**. Instrução Normativa nº 35, de 30 de novembro de 2004. Disponível em: [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizar toPo alMapa&chave=263917388](http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizar%20toPo%20alMapa&chave=263917388). Acesso dia 30 de janeiro de 2018.

- MIRANDA, M. **Revestimento Nanoestruturado de Cera de Carnaúba na Manutenção da Qualidade Póscolheita de Tomates**. Dissertação (dissertação em Biotecnologia). UFSC. São Carlos/SP, P.105. 2015.
- NATIONAL Research Council (NRC). **NUTRIENT Requeriments of Dairy Cattle**. 7th rev. Washington: Natl. Acad. Sci., 2001.
- NCR. **Nutrient requirements of swine. National Academy of Sciences** -National Research Council Washington, DC, 2012.
- PACHECO, D.; PATTON R.A.; PARYS C.; LAPIERRE H. Ability of commercially available dairy ration programs to predict duodenal flows of protein and essential amino acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 2, p. 937-963, 2012.
- PAZ, H. A., DE VETH, M. J., ORDWAY, R. S., & KONONOFF, P. J. “Evaluation of rumen-protected lysine supplementation to lactating dairy cows consuming increasing amounts of distillers dried grains with solubles” **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 11, p. 7210-7222, 2013.
- POLAN, C. E.; CUMMINS, K. A.; SNIFFEN, C. J. Responses of dairy cows to supplemental rumen-protected forms of methionine and lysine. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 12, p. 2997-3013, 1991.
- RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, p.1195-1236, 1998
- RISCH, S.J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, 1995. p.2-7. (ACS Symposium. Series, 590).
- ROSSAN, M. A. **Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas Lipídicas Sólidas para Aplicação em Cosméticos**. 2011. 215 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, Campinas, 2011.
- SANTOS, F.A.P. Metabolismo das proteínas In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.
- SAWANT, K. K., VARIA, J. K., & DODIYA, S. S. Cyclosporine a loaded solid lipid nanoparticles: optimization of formulation, process variable and characterization. **Current drug delivery**, v. 5, n. 1, p. 64-69, 2008.
- SCHWAB, C. G.; WHITEHOUSE, N. L.; MCLAUGHLIN, A. M.; KADARIYA, R. K; ST-PIERRE, N. R.; SLOAN, B. K.; GILL, R. M.; ROBERT, J. C. Use of milk protein concentrations to estimate the methionine bioavailability of two forms of 2- hydroxy-4-

methylthio butanoic acid (HMB) for lactating cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84 (Suppl.1), p. 146. 2001.

SCHWAB, C.G. **Balancing diets for amino acids: nutritional, environmental and financial implications**. Pages 1-13 In: Proc. Tri-State Dairy Nutr. Conf., Fort Wayne, EUA. The Ohio State University, Columbus, 2010.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v.33, n.6, p.501-547, 1993.

SHEGOKAR, R., SINGH, K. K., & MÜLLER, R. H. Production & stability of stavudine solid lipid nanoparticles—From lab to industrial scale. **International journal of pharmaceuticals**, v. 416, n. 2, p. 461-470, 2011.

SIDDIQUI, A., PATWARDHAN, G. A., LIU, Y. Y., NAZZAL, S. Mixed backbone antisense glucosylceramide synthase oligonucleotide (MBO-asGCS) loaded solid lipid nanoparticles: in vitro characterization and reversal of multidrug resistance in NCI/ADR-RES cells. **International journal of pharmaceuticals**, v. 400, n. 1-2, p. 251-259, 2010.

SILVA, V. M.; VIEIRA, G. S.; HUBINGER, M. D. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. **Food Research International**, v. 61, p. 132–143, 2014.

SOCHA, M. T., SCHWAB, C. G., PUTNAM, D. E., WHITEHOUSE, N. L., GARTHWAITE, B. D., & DUCHARME, G. A. Extent of methionine limitation in peak-, early-, and mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1996-2010, 2008.

VANDENBURG, L. E.; WILDER, E. A. The structural constituents of carnauba wax. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 47, n. 12, p. 514-518, 1970.

VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 4, p. 26-35, 2009.

VILLALOBOS-HERNÁNDEZ, J.R.; MÜLLER - GOYMANN, C.C. Novel nanoparticulate carrier system based on carnauba wax and decyl oleate for the dispersion of inorganic sunscreens in aqueous media. **European Journal of Pharmaceuticals and Biopharmaceutics**, v. 60, n. 1, p. 113, 2005.

WHITEHOUSE, N.L.; SCHWAB C.G.; TYLUTKI T.; SLOAN B.K.. Optimal lysine and methionine concentrations for milk protein production as determined with the latest versions of Dairy NRC 2001 and AMTS.Cattle. **Journal Dairy Sciences**, v. 93, n. Suppl 1, p. 253, 2013.

- WHORTON, C. Factors influencing volatile release from encapsulation matrices. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, 1995. p.134-142. (ACS Symposium Series, 590)
- YANG, L., GENG, Y., LI, H., ZHANG, Y., YOU, J., & CHANG, Y. Enhancement the oral bioavailability of praziquantel by incorporation into solid lipid nanoparticles. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 64(2), 86-89, 2009.
- YASSIN, A. E. B., ANWER, M. K., MOWAFY, H. A., EL-BAGORY, I. M., BAYOMI, M. A., & ALSARRA, I. A. Optimization of 5-flurouracil solid-lipid nanoparticles: a preliminary study to treat colon cancer. **International journal of medical sciences**, v. 64, n. 2, p. 86-89, 2009.
- YOO, J. H., SHANMUGAM, S., THAPA, P., LEE, E. S., BALAKRISHNAN, P., BASKARAN, R., HAN, K. Novel self-nanoemulsifying drug delivery system for enhanced solubility and dissolution of lutein. **Archives of pharmcal research**, v. 33, n. 3, p. 417-426, 2010.

CAPÍTULO 2 – Caracterização e avaliação da metionina *bypass* a partir da metionina microencapsulada em cera de carnaúba

Resumo

Objetivou-se microencapsular metionina em matriz lipídica de cera de carnaúba, através do método de Fusão-Emulsificação (*Melt emulsification*), tornando-a fonte de metionina *bypass* para ruminantes. Foram obtidos dois sistemas de metionina microencapsulada, nas seguintes proporções: 4:1 e 2:1 (cera de carnaúba:metionina). Os produtos finais foram avaliados quanto ao processo de microencapsulação por determinação de rendimento e eficiência, a caracterização dos sistemas microencapsulados por técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura, Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC), Termogravimetria (TG), além da quantificação do nitrogênio das duas formulações e da metionina livre. O método utilizado para proteger a metionina apresentou rendimento de 82,3% e 78,5% para 2:1 e 4:1, respectivamente. A eficiência do microencapsulado baseado na determinação da carga (teor de nitrogênio) apresentou alta taxa de retenção de núcleo, com destaque para o sistema 2:1 com 99,65% de eficiência. A obtenção da metionina microencapsulada (protegida), em matriz lipídica de cera de carnaúba, apresentou resultados satisfatórios, para os dois sistemas de 2:1 e 4:1 elaborados, tornando perceptível o potencial promissor da metionina protegida pela cera, matéria-prima regional de fácil aquisição, como fonte de metionina *bypass* para ruminantes.

Palavras-chave: degradação ruminal, Fusão-Emulsificação, proteção de aminoácidos

abstract

Microencapsular methionine was used in the lipid matrix of carnauba wax, using the Melt Emulsification method (*Melt emulsification*), making it the source of methionine *bypass* for ruminants. Two microencapsulated methionine systems were obtained in the following proportions: 4: 1 and 2: 1 (carnauba wax: methionine). The final products were evaluated for the microencapsulation process by determination of yield and efficiency, the characterization of microencapsulated systems by Scanning Electron Microscopy, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetry (TG), besides the quantification of the nitrogen of the two formulations and free methionine. The method used to protect methionine showed a yield of 82.3% and 78.5% for 2: 1 and 4: 1, respectively. The efficiency of the microencapsulation based on the determination of the load (nitrogen content) presented a high retention rate of nucleus, especially the 2: 1 system with 99.65% efficiency. The microencapsulated (protected) methionine in a lipid matrix of carnauba wax presented satisfactory results for both elaborated

2: 1 and 4: 1 systems, making the promising potential of methionine protected by wax, a regional raw material as a source of methionine bypass for ruminants.

Key words: Fusion-Emulsification, ruminal degradation, protection

1. Introdução

O Brasil destaca-se como umas das grandes potências mundiais na produção animal, destacando-se na produção de carne e leite, todo esse destaque depende de quatro fatores importantes: alimentação (nutrição), reprodução, genética e sanidade, tornando cada vez mais eficiente e intensificado para melhor aproveitamento e sustentabilidade dos processos de produção.

O sucesso da produção animal (carne e leite) está diretamente relacionado com o manejo alimentar adequado, ou seja, com a disponibilidade de nutriente no qual é ofertado no cocho, além disso, a qualidade e estratégia alimentar deve ser considerada. Portanto esse sucesso na nutrição animal é determinado pelo atendimento da exigência nutricional de cada categoria animal, buscando o máximo desempenho produtivo ao otimizar o uso dos nutrientes na dieta. Diante disso há uma busca por técnicas e alternativas que permitam maior aproveitamento dos nutrientes.

Os aminoácidos que chegam ao intestino delgado vão depender de sua síntese pelos microrganismos ruminais ou da fração que não foi totalmente degradada no rúmen. Segundo a NRC (2011), a metionina juntamente com a lisina, constituem os dois mais importantes aminoácidos limitantes em vacas de alta produção de leite, além de sua atuação indispensável para a fermentação ruminal e crescimento dos microrganismos. Entretanto, apenas a adição dos aminoácidos essenciais na ração dos ruminantes não constitui uma saída para atender suas exigências, uma vez que os microrganismos ruminais, degradam totalmente ou parcialmente esses nutrientes e utilizam para seu desenvolvimento, ou seja, a utilização de proteína para síntese de proteína (Broderick, 2009).

Diante disso a proteína *bypass* vem sendo usada com uma válvula de escape para otimizar a produção animal, tendo grande importância em atender as exigências de proteína no intestino delgado. É nesse sentido que tem concentrado várias pesquisas, objetivando proteger esses aminoácidos essenciais dos microrganismos ruminais, garantido sua integridade e desta forma sendo conduzido até o abomaso. As técnicas de microencapsulação da metionina são avaliadas com diferentes tipos de agentes encapsulantes, apresentando resultados variáveis.

Para tal, o processo de microencapsulação está sendo visto como uma nova alternativa para o fornecimento de aminoácidos protegidos, sendo liberados apenas no abomaso, aumentando a quantidade de nutrientes absorvidos e conseqüentemente na produção de leite, onde o animal apresenta exigência elevada de metionina, baseado nisso a cera de carnaúba é um agente promissor para encapsular tal aminoácido e protegê-lo do ambiente ruminal.

A cera de carnaúba constitui uma alternativa a ser investigada para microencapsular a metionina, uma vez que apresenta características hidrofóbica além de ser um produto natural de baixa ou nenhuma degradabilidade, já usado em agente de proteção em diferentes estudos Borba et al., (2013), usaram a cera de carnaúba como agente de hidrofobizador de bentonita, vermiculita e diatomita, obtendo resultados satisfatório

O presente estudo foi desenvolvido objetivando analisar o potencial da cera de carnaúba como agente encapsulante da metionina através da técnica de Fusão-Emulsificação (*Melt emulsification*).

2. Material e métodos

2.1. Preparo dos sistemas microencapsulados

As formulações de metionina microencapsulada em matriz lipídica de cera de carnaúba tipo I foram desenvolvidas pela técnica de Fusão-emulsificação (*Melt emulsification*), com proporções entre encapsulante e núcleo de 2:1 e 4:1, correspondente a 33,3% e 20% de metionina respectivamente. Para preparar as dispersões que resultaram nos produtos microencapsulados, as respectivas massas de metionina correspondentes a cada formulação foram pesadas em balança analítica, em seguida, a cera de carnaúba foi pesada separadamente e fundida em banho maria, sob temperatura de 90 °C.

Posteriormente, a metionina foi adicionada lentamente à cera, sob agitação constante até total homogeneidade. Em paralelo, 200 mL de água destilada foram aquecidos em chapa aquecedora até a mesma temperatura em que a cera foi fundida. Na água foi adicionado o agente tensoativo Tween 80 (volume de 2,5% com base no volume de água destilada).

A dispersão de metionina e cera de carnaúba foi adicionada lentamente à água quente, sob agitação constante de 500 rpm em agitador magnético para obtenção de uma emulsão do tipo óleo em água. Após adição de todo o conteúdo, a emulsão foi agitada por 3 min. As gotículas de cera foram solidificadas através da diminuição da temperatura do sistema, com adição de 100 mL de água fria.

Por fim, as partículas lipídicas contendo metionina foram separadas por peneiramento e submetida à lavagem com água destilada para remoção do excesso de tensoativo. Para a

eliminação do excesso de água, o material foi submetido à secagem convencional em estufa de circulação e renovação de ar sob temperatura de 40 °C por 5 h. Por fim, o produto microencapsulado foi macerado com almofariz e pistilo até obtenção de pó homogêneo, que foi acondicionado em temperatura ambiente. Essas condições e parâmetros foram definidos por meio de testes prévios (Medeiros 2017). De posse da metionina microencapsulada foi iniciada a caracterização do produto e as devidas investigações.

2.2. Avaliação dos sistemas microencapsulados

2.2.1. Rendimento de microencapsulação

A determinação de rendimento de microencapsulação foi baseada nas duas massas: cera de carnaúba e metionina, produtos usados no processo de microencapsulação, ou seja, baseada na seguinte equação:

$$RM = (M_{\text{final}}/M_{\text{inicial}}) \times 100$$

Onde: RE = Rendimento de Microencapsulação; M_{final} : Massa do produto microencapsulado após secagem; M_{inicial} = Massa seca da metionina e cera de carnaúba.

2.2.2. Eficiência de microencapsulação

Avaliou-se a eficiência dos microencapsulados através da quantidade de metionina retida na matriz de cera de carnaúba, ou seja, a quantidade de metionina inserida no processo de microencapsulação e teor final retido após o processo, conforme equação a seguir.

$$EM = (MetR/MetI) \times 100$$

Onde: EM = Eficiência de microencapsulação; MetR: Teor real de metionina retido; MetI: Teor de metionina inserido

2.3. Caracterização dos sistemas microencapsulados

2.3.1. Microscopia eletrônica de varredura

As micrografias eletrônicas de varredura foram obtidas através do Microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão de emissão por campo, marca FEI, modelo: Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (Silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001 (detector Apollo X-SDD), fabricado na cidade de Tóquio/Japão. As amostras foram fixadas em fita de carbono, recobertas com ouro em metalizador (Marca Quorum, modelo Q150R, cidade e país de fabricação) durante 30s, a 20

mA, por plasma gerado em atmosfera de argônio. A amostra de cera de carnaúba foi aterrada com tinta de prata.

2.3.2. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas foram obtidas em analisador térmico, modelo SDT Q600 V20.9 Build 20, sob atmosfera inerte em fluxo de 100 mL/min, taxa de aquecimento de 10°C/min, em uma faixa de temperatura de 30 a 600 °C, utilizando cadinho de platina contendo entre 6,5 e 8,5 mg de amostra.

Para obtenção da temperatura inicial de degradação foi usada A T_{onset} é identificada pelo cruzamento entre as linhas a e b, e é denominada de início extrapolado ou início matemático, com isso caracterizado o melhor ponto que representa a degradação dos compostos analisados.

2.3.3. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC, foram obtidas pelo mesmo instrumento utilizado para a termogravimetria, analisador térmico, modelo SDT Q600 V20.9 Build 20, simultaneous. Sob atmosfera inerte em fluxo de 100 mL/min, a taxa de aquecimento de 10°C/minuto, isso em uma faixa de temperatura até 1100°C, utilizando cadinho de platina, contendo cerca de 8,255 mg de amostra.

2.3.4. Determinação de nitrogênio total

A quantificação do nitrogênio foi realizada através da metodologia de *Kjeldahl*, descrito por AOAC (2012).

Os dados obtidos foram analisados para quantificar o nitrogênio da amostra a partir da fórmula:

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

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

3. Resultados e Discussão

O processo de microencapsulação já é bastante usado na tecnologia dos alimentos, com várias técnicas e finalidade deste processo, nesse estudo visa-se encapsular a metionina em cera

de carnaúba, para protegê-la dos microrganismos ruminais e conseqüentemente ter sua passagem para o abomaso, sendo disponível para absorção no intestino delgado.

Com a finalidade de avaliar a exequibilidade do processo de microencapsulação através da técnica Fusão-Emulsificação (*Melt emulsification*), na qual foi utilizada nesse estudo, foi averiguado o rendimento de microencapsulação das duas formulações, 2:1 e 4:1 (33,3% e 20% de metionina respectivamente), conforme demonstrado na Figura 1.

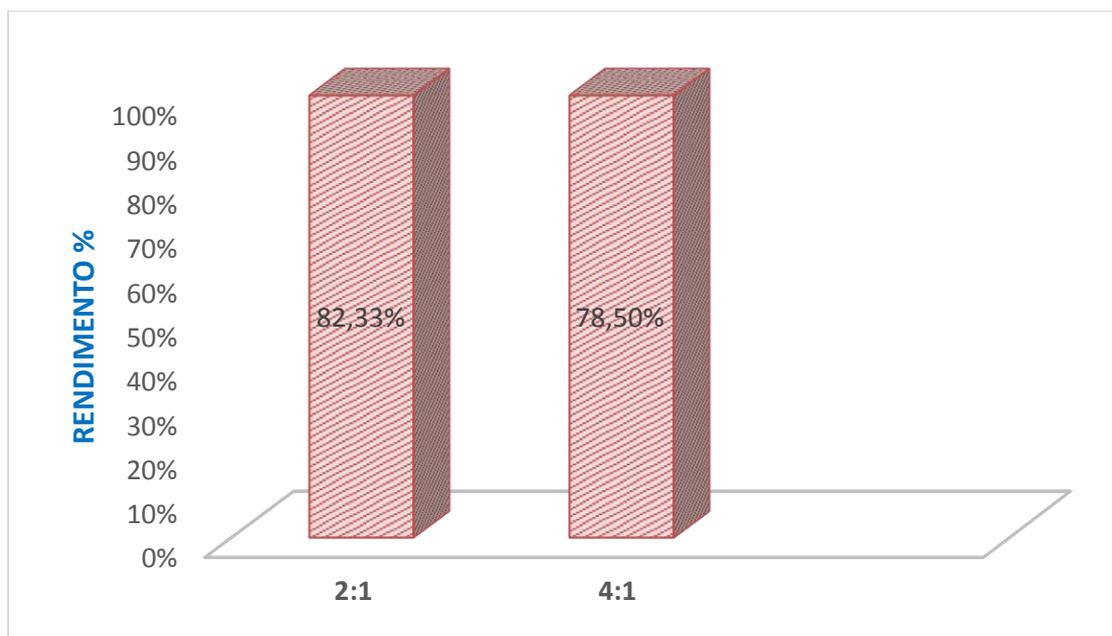


Figura – 1. Rendimento de microencapsulação da metionina em matriz de cera de carnaúba nas formulações de 4:1 e 2:1.

Observou-se que as duas formulações apresentaram valores relativamente altos de rendimento, 82,33% e 78,5% para as formulações 2:1 e 4:1 respectivamente. Esses valores indicam que o processo de microencapsulação da metionina em matriz lipídica de cera de carnaúba, através da técnica de Fusão-Emulsificação (*Melt emulsification*), é um processo viável, tendo ótimo aproveitamento, demonstrando um menor grau de perda do material durante o processamento.

O sistema 4:1 apresentou menor rendimento relação ao sistema 2:1 (33,3% de metionina), fato explicado pela quantidade maior de cera presente no sistema 4:1, o que eleva a viscosidade e aumenta a aderência durante o preparo.

A quantificação do teor de nitrogênio da metionina e dos dois sistemas microencapsulados permitiu estimar os valores de proteína bruta e calcular a eficiência do processo de microencapsulação através do nitrogênio total presente em cada amostra, como mostra os resultados na tabela 1.

Tabela 1. Quantificação do nitrogênio total, proteína bruta, teor teórico da metionina e eficiência da encapsulação.

Metionina/ Formulações	N total (%)	Proteína bruta (%)	Teor de metionina (%)	Eficiência da encapsulação (%)
Metionina	9,33±0,13	58,33±0,81	100	-
2:1	3,09±0,07	19,35±0,44	33,33	99,65±1,41
4:1	1,82±0,09	11,40±0,59	20,00	97,72±2,82

Os sistemas microencapsulados 2:1 4:1 apresentaram 19,35% e 11,40% de proteína bruta, respectivamente. Ao analisar os dados acima, verifica-se que os dois sistemas tiveram alta eficiência de microencapsulação, sendo eles acima de 97,5%, destaque para o sistema 2:1 onde apresentou 99,65% de eficiência, ou seja, esse sistema reteve praticamente toda metionina inserida.

Diante desses resultados pode-se afirmar que a cera de carnaúba atua como um excelente agente para microencapsular a metionina, uma vez que conseguiu reter praticamente todo o conteúdo inserido durante o processo.

A microscopia eletrônica de varredura permitiu uma análise morfológica da superfície de cada agente isolado (metionina e cera de carnaúba) além das duas formulações, 2:1 e 4:1, como demonstrado nas figuras 2 e 3 abaixo.

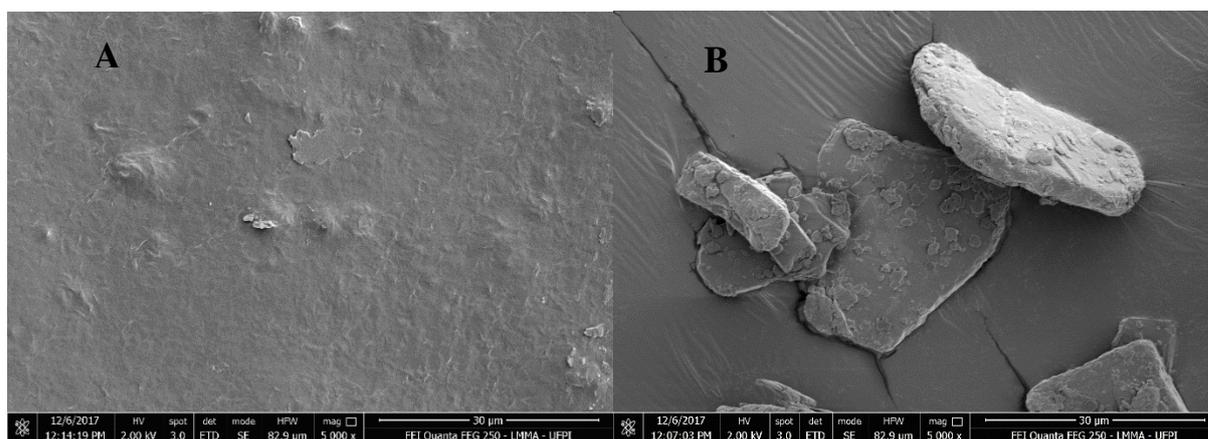


Figura 2 – micrografia eletrônica de varredura. A) matriz lipídica de cera de carnaúba B) metionina livre.

A cera de carnaúba apresentou superfície lisa, com pequenas elevações e algumas rugas, entretanto selada, sem porosidades, íntegra, mostrando-se se uma agente de difícil invasão do seu interior (figura 2 A). A metionina mostrou apenas superfícies irregulares, e com algumas aglomerações (figura 2 B).

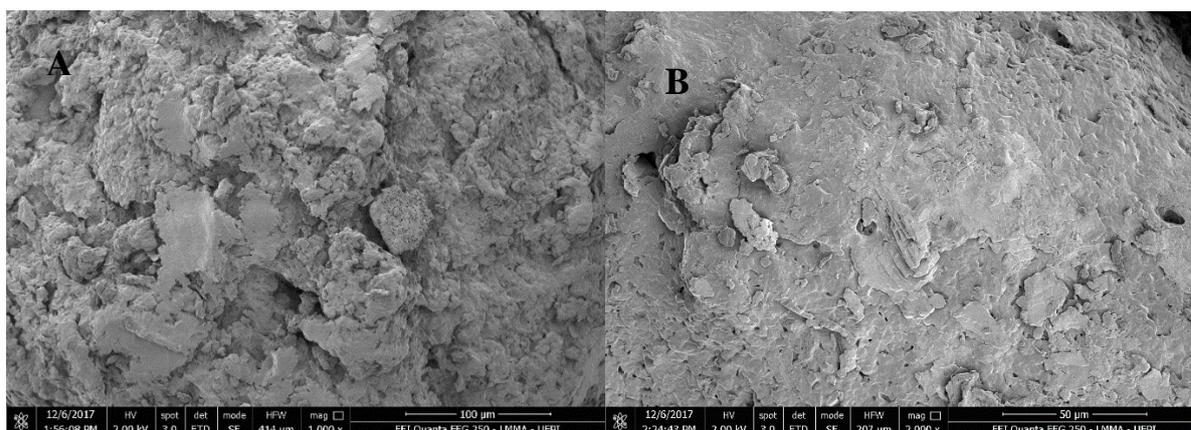


Figura 3 – a) Sistema microencapsulado formulação 2:1 b) Sistema microencapsulado formulação 4:1.

Os sistemas microencapsulados apresentaram superfícies com baixa incidência de poros. Considerando a superfície lisa da cera, é possível associar a rugosidade superficial com presença de metionina, o que foi mais evidente para o sistema 2:1, fato explicado por este sistema ter recebido maior teor de núcleo em relação ao sistema 4:1, o qual apresentou superfície mais lisa e selada, o que pode influenciar positivamente na efetividade da proteção da metionina frente ao ataque microbiano no rúmen.

De acordo Borba et al, (2013), a cera de carnaúba foi utilizada com êxito no processo de hidrofobização de betonita e vermiculita e diatomita, o estudo objetivou aumentar a capacidade absorviva dos compostos orgânicos, demonstrando efetividade diante da hidrofobização. Stojakovic et al (2012), ao utilizar cera de carnaúba como microencapsulante, a mesma mostrou bastante eficiência para encapsular valina.

A avaliação do comportamento térmico foi realizada através da termogravimetria (TG), na Figura 4, pode-se observar as curvas termogravimétricas de cada fase isolada, em função da temperatura e dos dois sistemas microencapsulados.

Segundo Alves (2008), nas curvas termogravimétricas, os degraus em relação aos eixos das ordenadas x e y, representam as variações de massa que são sofridas pela as amostras no percorrer das análises. Diante disso, a curva de termogravimétria é um método de análise quantitativo e qualitativo, pelo qual reproduz resultado rápido e produtivo, sendo muito usados no controle de qualidade das amostras e melhorar o produto final (Aragão, 2006).

A metionina apresentou dois estágios de degradação, com perdas de massa de 86,8 e 9,5%, respectivamente, além de Tonset em 269,67 °C. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Mallakpour & Marefatpour (2014), que constataram temperatura de

degradação térmica da metionina entre 200 e 310 °C. Silva (2014) também encontrou valores semelhantes para a metionina entre 250 a 300 °C.

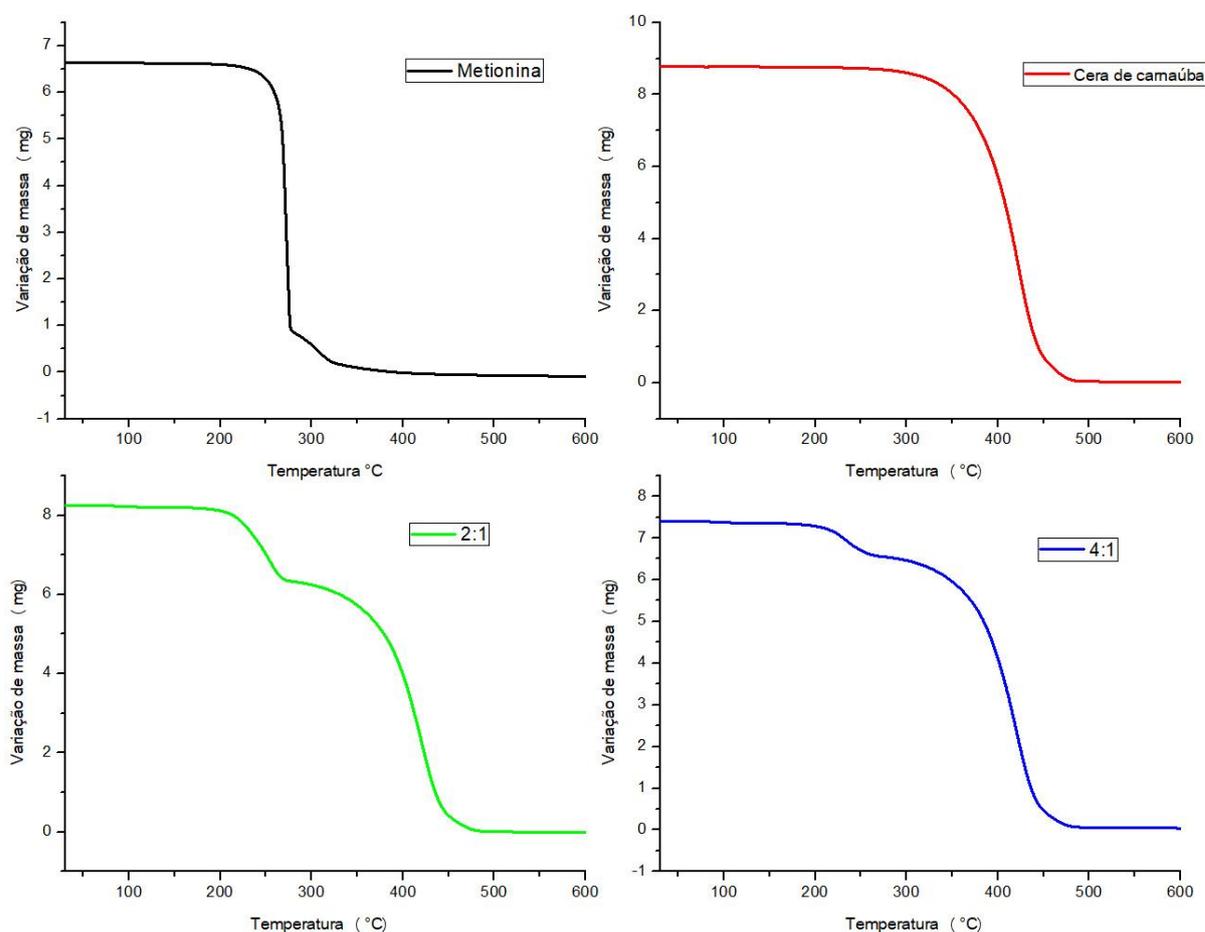


Figura 4 – Curvas termogravimétricas da metionina, cera de carnaúba, e as formulações 2:1 e 4:1.

A cera de carnaúba apresentou uma única etapa de degradação térmica, com Tonset em 374,62 °C e perda de massa de 99%. Os resultados corroboram com Stojakovic (2012), ao estudar liberação de vanilina encapsulada em microcápsulas de cera de Carnauba, estágio de degradação térmica da cera de carnaúba entre 228 e 338°C. Sendo compatível também com os resultados obtidos por Chiumarelli & Hubinger (2014), onde verificou que a maior perda de massa da cera de carnaúba é entre 210 e 400°C.

Ambos os sistemas microencapsulados apresentaram dois estágios de degradação térmica, em que o sistema 2:1 com perda de massa de 22,6% no primeiro e 77,4% no segundo, e Tonset em 218,68 °C. Já o sistema 4:1 apresentou 11,2% de perda de massa no primeiro estágio e 88,8% no segundo, com Tonset em 210,93 °C. Todos os dados retirados das respectivas curvas TG encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Dados extraídos das curvas termogravimétricas

Material	1° estágio (°C)	Δm_1 (%)	2° estágio (°C)	Δm_2 (%)	T _{onset} - 1° estágio (°C)
Metionina	210-286	86,83	288-337	9,5%	269,67
Cera de carnaúba	291-496	99	-	-	374,62
2:1	189-282	22,60	291-496	76,42	218,68
4:1	171-280	11,26	291-496	88,11	210,93

Δm_1 % – Porcentagem de massa perdida no primeiro estágio; Δm_2 % – Porcentagem de massa perdida no segundo estágio; T_{onset} 1° - Menor temperatura em que pode ser detectado o início da variação de massa

Observou-se que em ambos os sistemas microencapsulados, a metionina apresentou temperatura inicial de degradação (Tonset) menor quando comparada à sua forma livre. Todavia, a metionina livre perdeu 86,83% de massa no primeiro estágio de degradação. Considerando que esses dois sistemas receberam 33,3% (2:1) e 20% (4:1) de metionina e a retenção real foi de 33,18% (2:1) e 19,54% (4:1), deveria ter havido, comparando com a metionina livre, proporcionalmente, neste primeiro estágio, perdas de 28,11% (2:1) e 16,96% (4:1). No entanto, as formulações 2:1 e 4:1 perderam, respectivamente, 22,87 e 11,26% de massa, o que corresponde a 81,35% e 66,39% de perda de massa, menores, portanto, que os 86,83% da metionina livre. Isso confirma a proteção da metionina pela cera de carnaúba após microencapsulação, assim como sugere uma proteção mais efetiva para a formulação 4:1, já que a massa degradada foi bem inferior à da metionina livre e à da formulação 2:1 no estágio em questão. Ambos os sistemas apresentaram uma faixa de temperatura maior de degradação nesse primeiro estágio, indicando uma menor velocidade de degradação térmica, em especial para a formulação 4:1. Essa proteção mais exitosa para o sistema 4:1 pode ser explicada pelo fato desta possuir menor teor de núcleo, possibilitando obter um sistema mais homogêneo, com melhor distribuição da metionina no interior da matriz lipídica, diminuindo a ocorrência de metionina superficial, conforme demonstrado por MEV.

Ao contrário da termogravimetria (TG) a calorimetria diferencial exploratória (DSC), baseia-se na entalpia e não na massa. Sendo de suma importância para complementar os resultados da termogravimetria (Matos et al., 2009).

A técnica de DSC permitiu determinar o ponto de fusão, fator importante para um sistema de microencapsulado cujo agente encapsulante um cerídeos, uma vez que, pode-se avaliar condições de armazenamento, além de estabilidade térmica do produto. As curvas de

DSC da metionina, cera de carnaúba e os dois sistemas microencapsulados estão expostos abaixo na Figura 5.

Nesse estudo, a metionina e a cera de carnaúba apresentaram apenas eventos endotérmicos, a cera de carnaúba teve ponto de fusão de 85,39°C, corroborando com Rossan (2011), onde afirma que a cera de carnaúba tipo I, tem ponto de fusão entre 83 a 86°C. Os dois sistemas microencapsulados 2:1 e 4:1 apresentaram ponto de fusão em 85,03 °C (Figura 5, Evento 1), valor semelhante ao da cera de carnaúba pura, o que implica que as formulações podem ser armazenadas em temperatura ambiente, mesmo em regiões com altas temperaturas, como as típicas no nordeste do Brasil, que não haverá dano térmico.

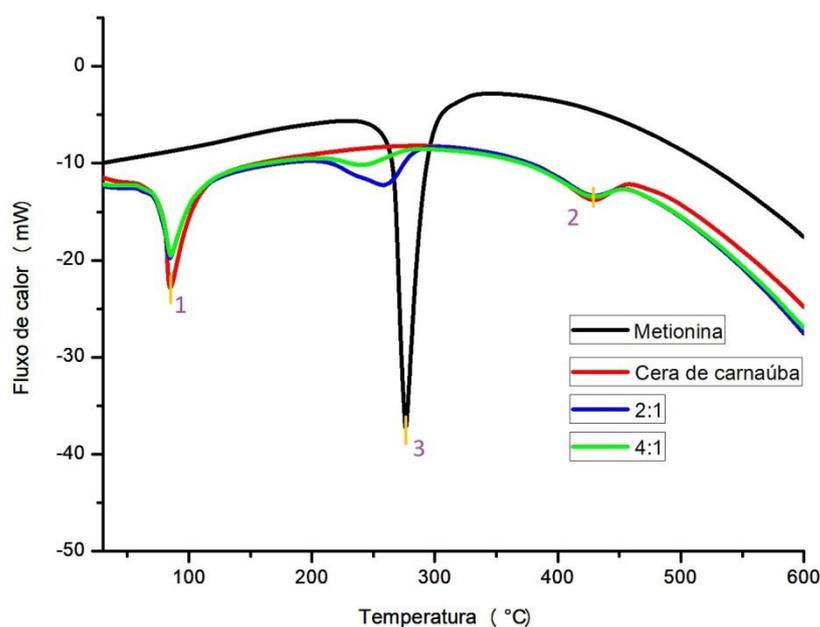


Figura 5 – Curvas de DSC, da Metionina livre, Cera de carnaúba e das duas formulações 2:1 (33,3% de metionina) e 4:1 (20% de metionina).

A cera de carnaúba e os dois sistemas microencapsulados apresentaram a mesma temperatura de degradação térmica em 427,03 °C (Figura 5 – Evento 2). Já a metionina livre exibiu degradação térmica em 277,41 °C (Figura 5 – Evento 3), enquanto a metionina nos sistemas microencapsulados apresentou degradação térmica em 257,52 °C e 242,39 °C para 2:1 e 4:1, respectivamente, valores menores quando comparados à metionina livre, conforme também observado por TG. Considerando que a cera de carnaúba manteve suas temperaturas típicas de fusão e degradação térmica, essa diminuição na estabilidade térmica da metionina não é decorrente de reação/interação com a cera, mas provavelmente devido a forças

intermoleculares (Pontes de hidrogênio) das moléculas de metionina entre si. De maneira geral, esta interação não afeta a integridade dos sistemas microencapsulados ou a proteção do núcleo.

4. Conclusão

Ambas as formulações estudadas (2:1 e 4:1) apresentaram bons resultados e não diferiram consideravelmente entre si. O sistema 4:1 apresentou uma microestrutura mais íntegra, além de menor velocidade de degradação térmica da metionina, enquanto o sistema 2:1 apresentou maior rendimento e eficiência de microencapsulação, maior retenção de metionina e maior temperatura inicial de degradação. Portanto, os dois sistemas apresentaram resultados animadores quanto à proteção do aminoácido investigado para possível disponibilidade de proteína *bypass*, evidenciando que a matriz lipídica de cera de carnaúba é um agente encapsulante adequado para tal finalidade.

Referências

- ALVES, M. S. M. **Caracterização farmacognóstica, físico-química e estudos preliminares de pré-formulação da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt.** 2008. 114 f. Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Pará, Belém, 2008
- AOAC, **Association of Analytical Chemists. Official Methods of Analysis.** 14th Edition Washington DC, 1984.
- ARAGÃO, C. F. S.; MACEDO, R. O.; MEDEIROS, M. A. P.; VIANA, F. L. M.; SILVA, I. D. D.; MIRANDA, N. A. Estudo do comportamento termogravimétrico da *Aloe barbadensis* Mill (Liliaceae) e da *Conyza bonariensis* I (Compositae). **Bio Farma – Revista Técnica Científica, Farmacologia e Bioquímica Análise Clínica e Toxicológica**, v. 1, n. 3, p. 172-180, 2006.
- BORBA, L.L.S.; OLIVEIRA, M.F.D.; MELO, M.A.F.; MELO, D.M.A.; PERGHER, S.B.C. Preparação de adsorventes à base de materiais naturais hidrofobizados com cera de carnaúba. **Perspectiva**. v.37, n.139, p. 37-46, 2013.
- BRODERICK GA & REYNAL S, M. “Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows” **Journal of Dairy Science** 92, v. 92, n. 6, p. 2822-2834, 2009.

- CHIUMARELLI, M; HUBINGER, M.M. Evaluation of edible films and coatings formulated with cassava starch, glycerol, carnauba wax and stearic acid. **Food Hydrocolloids**, v. 38, p. 20-27, 2014.
- DETMANN, E., SOUZA, M. A., VALADARES FILHO, S. C., QUEIROZ, A. C., BERCHIELLI, T. T., SALIBA, E. O. S., AZEVÊDO, J. **Métodos para análise de alimentos – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012.
- MALLAKPOUR, S.; MAREFATPOUR, F. Novel chiral poly (amide-imide)/surface modified SiO₂ nanocomposites based on *N*-trimellitylimido-l-methionine: Synthesis and a morphological study. **Progress in Organic Coatings** v. 77, n. 8, p. 1271-1276, 2014.
- MATOS. J.R.; MERCURI, L.; BARROS, G. Análises térmicas aplicadas a fármacos e medicamentos. In: STORPIRTIS, S. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. Cap. 4, p. 32-65.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **NUTRIENT Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. Washington: Natl. Acad. Sci., 2001.
- POLAN, C. E., CUMMINS, K. A., SNIFFEN, C. J., MUSCATO, T. V., VICINI, J. L., CROOKER, B. A., MULLER, L. D. Response of dairy cows to supplemental rumen-protected forms of methionine and lysine. **Journal Dairy Science**, v. 74, n. 9, p. 2997-3013, 1991
- ROSSAN, M. A. **Preparação e Caracterização de Micro e Nanopartículas Lipídicas Sólidas para Aplicação em Cosméticos**. 2011. 215 p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP, Campinas, 2011.
- SALTER, D. N.; DANESHVAR, K.; SMITH, R. H. SALTER, D.N. The origin of nitrogen incorporated into compounds in the rumen bacteria of steers given protein and urea containing diets. **British Journal of Nutrition** v. 41, n. 1, p. 197-209, 1979.
- SILVA, C, M. **Síntese e caracterização de complexos metálicos baseados em cobre-aminoácidos para avaliação da atividade larvicida em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2014. 57 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Exatas - UFGD Dourados – 2014.
- STOJAKOVIC, D.; BUGARSKI, B.; RAJIC, N. A kinetic study of the release of vanillin encapsulated in Carnauba wax microcapsules. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.640–642, 2012.

CAPÍTULO 3- Degradabilidade *in situ* de metionina microencapsulada em matriz de cera de carnaúba

Resumo

Objetivou-se verificar a eficiência de proteção da metionina microencapsulada em matriz lipídica de cera de carnaúba a partir da degradabilidade *in situ* da matéria seca e proteína bruta em ovinos, fornecendo assim proteína *bypass* a ser utilizada para incremento da produção pelos animais ruminantes. O delineamento experimental adotado foi o em blocos casualizados (DBC), sendo quatro tratamentos: duas formulações de metionina microencapsulada em matriz de cera de carnaúba, nas proporções de cera de carnaúba e metionina de 2:1 e 4:1, respectivamente, a metionina e matriz da cera de carnaúba livres usando como repetição dois ovinos canulados no rúmen, em parcelas subdivididas no tempo (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 h de incubação), com duração de 32 dias, sendo quatro dias para cada ensaio e quatro dias de adaptação dos animais às formulações experimentais. A degradação *in situ* demonstrou uma alta eficácia na proteção da metionina, nos dois sistemas estudados. Na formulação 2:1 a proteção foi de 83,2% no tempo máximo (72 h), enquanto que para a formulação 4:1 esta foi de 88,7%, valores relativamente altos de proteção do aminoácido. O perfil de liberação de nitrogênio mostrou uma proteção do núcleo de 91% da formulação 2:1 e 95,8% para a 4:1, ou seja, resultados excelentes de proteção do núcleo. As micrografias após teste *in situ* no tempo máximo não apresentaram sinais de biodegradação pelos microrganismos ruminais, mantendo assim sua integridade, reforçando a justificativa de que a cera realmente é um produto pelo o qual protege o aminoácido da ação de microrganismos. A microencapsulação de metionina com cera de carnaúba mostrou-se eficaz na obtenção de proteína por passagem, recomendando as duas formulações pois aumenta a disponibilidade de metionina para o intestino como fonte de proteína *by pass*.

Palavras-chaves: integridade, microrganismos ruminais, proteção de aminoácidos

Abstract

The objective of this study was to verify the efficiency of protection of microencapsulated methionine in lipid matrix of carnauba wax from the *in situ* degradability of dry matter and crude protein in sheep, thus providing bypass protein to be used to increase production by ruminant animals. The experimental design was a randomized complete block (DBC), four treatments: two formulations of methionine microencapsulated in carnauba wax matrix, in the proportions of carnauba and methionine waxes of 2: 1 and 4: 1, respectively, methionine and free carnauba wax matrix using two replicate sheep in the rumen, as subdivided in time (0, 3,

6, 9, 12, 24, 48 and 72 h of incubation), with a duration of 32 days, four days for each test and four days of adaptation of the animals to the experimental formulations. In situ degradation demonstrated a high efficacy in methionine protection in the two systems studied. In the 2: 1 formulation the protection was 83.2% at the maximum time (72 h), whereas for the 4: 1 formulation this was 88.7%, relatively high values of amino acid protection. The nitrogen release profile showed a core protection of 91% of the 2: 1 formulation and 95.8% for the 4: 1, that is, excellent protection results from the core. The micrographs after in situ test in the maximum time did not show signs of biodegradation by the ruminal microorganisms, thus maintaining its integrity, reinforced the justification that the wax really is a product by which it protects the amino acid from the action of microorganisms. The microencapsulation of methionine with carnauba wax proved to be effective in obtaining protein by passage, recommending both formulations since it increases the availability of methionine to the intestine as a source of protein by pass.

Key words: integrity, ruminal microorganisms, amino acid protection

1. Introdução

Os aminoácidos são os componentes que formam a molécula de proteína, existindo mais de duzentos tipos disponíveis na natureza, entretanto apenas vinte destes aminoácidos são encontrados nos componentes das proteínas (McDonald et al., 2010). A metionina é um dos vinte aminoácidos que compõem as proteínas. Este aminoácido necessita ser fornecido aos ruminantes, uma vez que, ela faz parte dos dez aminoácidos que não são sintetizados pelos microrganismos ruminais. A proteína microbiana constitui a mais importante fonte de proteína para os ruminantes, a qual é produzida em grande quantidade pelos microrganismos ruminais, pelo qual é limitada em relação aos aminoácidos essenciais, por tal, as estratégias de suplementação com metionina e lisina em vacas de leite são de grande valia quando se busca otimizar a produção, aumento o fluxo desses aminoácidos no duodeno.

Segundo Cabrita *et al.* (2011), quando a dieta dos ruminantes é principalmente à base de soja, a metionina é o aminoácido limitante para a produção, enquanto que quando à base de milho, a lisina que se torna o aminoácido limitante, sendo assim a dieta à base desses produtos, tornará a mesma pobre nestes aminoácidos essenciais. Além disso, a metionina é um aminoácido limitante na produção animal e sua inserção na dieta dos ruminantes tem por principais objetivos aumentar o fluxo da produção de proteína microbiana, bem como o escape para o intestino ofertando proteína não degradável no rúmen digestível também chamada de

proteína *bypass*. Isto é uma forma de otimizar a produção sendo assim a proteção de metionina uma opção para alcançar o intestino delgado e aumentar o fluxo desse aminoácido de alto valor biológico no duodeno.

Neste sentido, o uso da cera de carnaúba como agente encapsulante, dá-se pelo fato dela ser um produto resistente à solubilização e bastante duro, quebradiça e apresenta ponto de fusão entre 83 a 86°C (Rossan, 2011). A cera de carnaúba constitui um excelente agente para microencapsular a metionina, uma vez que, apresenta característica hidrofóbica além de ser um produto natural de baixa ou nenhuma degradabilidade e sem toxicidade aos microrganismos ruminais, é um produto oriundo das folhas das carnaubeiras (*Copernicia prunifera*). Dessa forma, hipotetizou-se que microencapsular a metionina em matriz de cera de carnaúba poderá protegê-la eficientemente do ataque dos microrganismos aumentando assim o fluxo de proteína *bypass* a partir da metionina no intestino delgado. Assim, objetivou-se verificar a eficiência de proteção da metionina microencapsulada em matriz lipídica de cera de carnaúba a partir da degradabilidade *in situ* da matéria seca dos alimentos, fornecendo proteína *bypass* a ser utilizada como incremento da produção de animais ruminantes.

2. Materiais e métodos

2.1. Local do experimento

O processo de microencapsulação da metionina com matriz de cera de carnaúba ocorreu no laboratório de nutrição animal (LANA) da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG no Centro de Saúde e Tecnologia Rural / CSTR no município de Patos – PB. No qual foi transportado para outros centros para seguir com as análises físicas e químicas do produto. A avaliação *in situ* foi conduzida no setor pequenos ruminantes vinculados ao Colégio Técnico de Bom Jesus (CTBJ), entre os meses de dezembro de 2017 e janeiro de 2018, localizado no município de Bom Jesus-PI, apresentando latitude sul 09°04'28 e longitude oeste 44°21'31.

2.2. Formulação da metionina microencapsulada

As formulações de metionina microencapsulada em matriz lipídica de cera de carnaúba tipo I foram desenvolvidas pela técnica de Fusão-emulsificação (*Melt emulsification*), com proporções entre encapsulante e núcleo de 2:1 e 4:1, correspondente a 33,3% e 20% de metionina respectivamente. Para preparar as dispersões que resultaram nos produtos microencapsulados, as respectivas massas de metionina correspondentes a cada formulação

foram pesadas em balança analítica, em seguida, a cera de carnaúba foi pesada separadamente e fundida em banho maria, sob temperatura de 90 °C.

Posteriormente, a metionina foi adicionada lentamente à cera, sob agitação constante até total homogeneidade. Em paralelo, 200 mL de água destilada foram aquecidos em chapa aquecedora até a mesma temperatura em que a cera foi fundida. Na água foi adicionado o agente tensoativo Tween 80 (volume de 2,5% com base no volume de água destilada).

A dispersão de metionina e cera de carnaúba foi adicionada lentamente à água quente, sob agitação constante de 500 rpm em agitador magnético para obtenção de uma emulsão do tipo óleo em água. Após adição de todo o conteúdo, a emulsão foi agitada por 3 min. As gotículas de cera foram solidificadas através da diminuição da temperatura do sistema, com adição de 100 mL de água fria.

Por fim, as partículas lipídicas contendo metionina foram separadas por peneiramento e submetida à lavagem com água destilada para remoção do excesso de tensoativo. Para a eliminação do excesso de água, o material foi submetido à secagem convencional em estufa de circulação e renovação de ar sob temperatura de 40 °C por 5 h. Por fim, o produto microencapsulado foi macerado com almofariz e pistilo até obtenção de pó homogêneo, que foi acondicionado em temperatura ambiente. Essas condições e parâmetros foram definidos por meio de testes prévios (Medeiros 2017).

2.3. Animais e Manejo

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal de Campina Grande (protocolo número 205/2014). Para a avaliação *in situ* utilizou-se quatro ovinos machos castrados, adultos pesando em média $60 \pm 3,21$ kg, sendo eles providos de fístula ruminal. Os animais foram mantidos nas baias individuais, com comedouros e bebedouros individuais sendo alimentados com volumoso e concentrado na relação de 60:40 respectivamente, na forma de mistura total da ração, sendo o volumoso composto com capim elefante (*Pennisetum purpureum*), e o concentrado à base de milho, soja e um núcleo mineral (Ovinofós), calculado em 100 kg da seguinte forma: 81,4 kg de milho, 16,1 kg de soja e 2,19 kg do núcleo mineral, era fornecido 1,5% do peso vivo dos animais, fornecidos diariamente em duas porções iguais, às 7:30 e 16:00 horas de acordo NRC (2011) conforme a Tabela 1 e água fornecida *ad libitum*.

Os animais foram mantidos em baias individuais medindo cerca de 1,40 m de largura de 2,95 m de comprimento, cobertas de telha de barro e com piso de cimento, cercado de poste de madeira e arame liso.

Tabela 1 – composição da dieta fornecida aos animais durante o experimento

Item	Nome científico	MS %	PB %	FDN %	FDA %
Milho	Zea mays	29,5	10,05	56,08	28,18
Soja	Glycine max	90,95	27,81	27,69	6,77
Capim elefante roxo	Pennisetum purpureum	10,92	10,82	62,28	32,51

Núcleo mineral	Ovinofós	Minerais	Mg	G
		Zinco	3.800,0	
		Sódio	-	147,00
		Manganês	1.300,00	-
		Cobalto	40,00	-
		Ferro	1.800	
		Cobre	590,00	
		Enxofre		18,00
		Selênio	15,00	
		Iodo	80,00	
		Cromo	20,00	
		Molibdênio	300,00	
		Cálcio		120,00
		Flúor	870,00	
		Fósforo	87,00	

MS – Matéria seca; PB – proteína bruta; FDN - fibra em detergente neutro, FDA - fibra em detergente ácido; Mg – Miligrama; G - grama

2.4. Degradabilidade in situ da matéria seca e proteína bruta

Foram determinadas a degradação ruminal da MS e PB por meio da utilização de sacos de tecido não-tecido (TNT –100g/m², 5 × 5cm), segundo Casali et al. (2008) com porosidade de 50 µm, estes foram pesados e acondicionados 1,0 g de MS das duas formulações 2:1 e 4:1, além da cera pura e da metionina livre que também foram avaliados nos testes *in situ*.

Após 13 dias de adaptação às condições experimentais, os sacos foram incubados em quadruplicata nos tempos 72, 48, 24, 12, 9, 6, 3 e 0 horas, contabilizando 4 sacos, em cada tempo para cada animal, ou seja, em 72 horas de experimento era colocado em cada animal 28 sacos e os 4 sacos do tempo zero colocados juntos aos demais após a retirada do rúmen, totalizando 128 sacos por amostra nos quatro animais, no qual era marcado com o número, tempo e animal. Após os períodos de incubação, os sacos de TNT foram retirados do rúmen, lavados em água fria corrente e posteriormente secos em estufa com ventilação de ar forçada, $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h.

As análises do resíduo da incubação, a MS e PB foram realizadas de acordo com a técnica da AOAC (2012). Para a interpretação do grau de degradação da MS e PB foi utilizado um modelo assintótico exponencial de primeira ordem, proposto por Orskov e McDonald (1979):

$$P = a + b \times (1 - \exp^{-ct}),$$

em que:

P = degradabilidade potencial do alimento;

t = tempo de incubação

a = representa o substrato solúvel e rapidamente degradável;

b = representa o substrato insolúvel, mas potencialmente degradável;

c = taxa constante da função b.

A degradabilidade efetiva ou teórica da metionina e dos sistemas foi calculada pela equação:

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

Em que: DE é degradabilidade efetiva e k, taxa de passagem de partículas no rúmen

A degradabilidade potencial foi obtida por: $DP = a + b$

A fração potencialmente indegradada (I) foi determinada como: $I = 100 - (a + b)$

As degradabilidades efetivas foram calculadas utilizando-se valor único de taxa de passagem de partículas no rúmen-retículo de 8%/h.

2.5. Avaliação e perfil do nitrogênio do microencapsulado antes e após a cinética de degradabilidade e análise microscópica no tempo 72 horas após incubação

Após o processamento e incubação das amostras, foram analisados o perfil de nitrogênio, para isso, utilizou-se a metodologia de *Kjeldahl*, descrito por AOAC (2012). Essa

análise tem por finalidade verificar a quantidade de nitrogênio da metionina livre e dos sistemas microencapsulados, com isso analisar também a taxa de liberação *in situ*.

Os dados obtidos foram analisados para quantificar o nitrogênio da amostra a partir da fórmula:

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

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

Além disso após incubação foram obtidas novas micrografias para avaliar a possível ocorrência de ataque microbiano (biodegradação) real para avaliar o perfil de degradabilidade pelos microorganismos, as micrografias foram obtidas em um Microscópio eletrônico de varredura (MEV) com canhão de emissão por campo, marca FEI, modelo Quanta FEG 250, com tensão de aceleração de 1 a 30 kV, equipado com EDS de SDD (Silicon drift detectors), marca Ametek, modelo HX-1001 (detector Apollo X-SDD). As amostras foram recobertas com Au na metalizadora, marca Quorum, modelo Q150R, durante 30s, a 20 mA, por plasma gerado em atmosfera de argônio. Na qual foram fixadas em fita adesiva dupla face de carbono. A amostra de cera de carnaúba foi aterrada com tinta de prata.

2.6. Análise estatística

O delineamento experimental adotado foi o em blocos casualizados (DBC), sendo quatro tratamentos duas formulações de metionina microencapsulada em matriz de cera de carnaúba, nas proporções de cera de carnaúba e metionina de 2:1 e 4:1, respectivamente, a metionina e a matriz da cera de carnaúba livre usando como repetição quatros ovinos canulados no rúmen, em parcelas subdivididas no tempo (0, 3, 6, 9, 12, 24, 48 e 72 horas de incubação), com duração de 32 dias, sendo quatro dias para cada ensaio e quatro dias de adaptação dos animais às formulações experimentais.

A análise estatística para a cinética de degradabilidade *in situ* foi através do modelo experimental, tempo de incubação do material, animal, período e tempo de tratamento \times tempo, na seguinte fórmula:

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

em que: Y_{ijkl} = observação do efeito do tratamento i no tempo de incubação J no período k; μ = média geral; T_i = efeito do nível A (tratamento, i = (2:1; 4:1); B_j = efeito do nível B [tempo de incubação para a degradabilidade (j = 0, ..., 72); A_k = efeito do animal (k = 1, ..., 4), P_l = efeito

de período (tempo, $l = 1, 2$); AB_{ij} = interação entre tratamento i (nível) e tempo j ; e e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação.

Para a interpretação dos resultados foi realizada uma análise de variância e regressão, adotando-se nível de 5% de probabilidade, no qual os modelos foram selecionados com base no coeficiente de determinação e na significância dos coeficientes de regressão, adotando-se nível de 5% de probabilidade, utilizando-se o teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas pelo pacote computacional SAS (2012).

3. Resultados e discussão

3.1. Degradabilidade *in situ*

Os resultados obtidos para as frações a, b e c, degradabilidade efetiva (DE) e potencial (DP) estão exposto na Tabela 1, isto é para os valores de degradabilidade *in situ*, da matéria seca, além das equações R^2 . Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as frações e degradabilidade efetiva e potencial nos dois sistemas estudados, havendo diferença apenas entre a metionina livre, Tabela 1.

Verificando os dados exposto na tabela 1, observa-se alta degradabilidade potencial e efetiva da matéria seca da metionina livre, sendo considerada totalmente degradada quando exposta ao ambiente ruminal, em média 100% para a DE e 97,20% para DP, entretanto os sistemas microencapsulados 2:1 e 4:1, obtiveram médias de 6,5%, 17% de DE e DP respectivamente, constatando assim a proteção dos dois sistemas estudados.

Tabela 2. Estimativas da fração solúvel inicial (A), fração insolúvel potencialmente degradável (B), fração indigerível (C), fração potencialmente indegradada (I), degradação efetiva (DE) e degradação potencial (DP) da matéria seca.

Tratamentos	A(%)	B (%)	C (%)	I (%)	DP	DE	R^2
Metionina livre	2,80 ^a	94,39 ^a	0,1537 ^a	2,80 ^a	97,20 ^a	100 ^a	0,70
Prop_2:1	1,21 ^{ab}	15,82 ^b	0,0597 ^a	82,96 ^b	17,03 ^b	6,5 ^b	0,79
Prop_4:1	0,13 ^b	16,13 ^b	0,01535 ^a	84,73 ^b	16,26 ^b	4,1 ^b	0,80

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem ao teste de Tukey com 5% de probabilidade

Prado (2013), ao estudar a degradabilidade da metionina protegida até o tempo 72 horas, obteve para as frações a, b e c, 7,67%, 48,01% e 0,0489% respectivamente, além disso a DE 31,41% e DP 55,68% resultados semelhantes aos de Acosta (2012), ou seja, valores muito acima do verificado neste trabalho, Tabela 1, confirmando que a cera carnaúba atua de forma mais eficiente ao proteger o aminoácido.

Quanto à degradabilidade potencial da matéria seca, nos tempos estudados, não houve diferença significativa para os dois sistemas até o tempo 9 horas, porém nos tempos 12 às 72 horas, houve diferença significativa ($P < 0,05$), conforme demonstra Tabela 1. Sendo destaque o sistema 4:1, com apenas 11,27% de degradabilidade no tempo 72 horas.

Tabela 3. Degradabilidade potencial da matéria seca da metionina livre e das duas proporções 2:1 e 4:1 nos respectivos tempos (% H)

Tratamentos	TEMPOS (H)							R ²
	3	6	9	12	24	48	72	
Metionina livre	73,46 ^a	82,25 ^a	87,77 ^a	91,24 ^a	96,24 ^a	97,17 ^a	97,2 ^a	0,35
Prop_2:1	1,23 ^b	3,82 ^b	5,97 ^b	7,76 ^b	12,44 ^b	15,86 ^b	16,72 ^b	0,89
Prop_4:1	2,06 ^b	2,69 ^b	3,30 ^b	3,88 ^c	5,94 ^c	9,09 ^c	11,27 ^c	0,84

Médias seguidas de letras iguais nas colunas, não diferem ao teste de Tukey com 5% de probabilidade;

A metionina livre obteve uma degradabilidade alta, desde o tempo 3 (horas), acima de 70%, sendo degradada quase que totalmente nos tempos 48 e 72 (horas), entretanto os sistemas microencapsulados apresentaram mínimo de 1,14%, e 2,03%, máximo de 16,84% e 11,31 para a Prop_2:1 e Prop_4:1 respectivamente. Os resultados revelam boa proteção do aminoácido, com valores não degradados de de 83,4% (2:1) e 88,78% (4:1), ou seja, valores promissores, demonstrando assim que a cera de carnaúba pode ser utilizada com agente encapsulante para a metionina, protegendo-a de ação dos microrganismos ruminais.

Estudo realizado por Bueno et al. (2003), ao proteger metionina com película de etilcelulose e ácido esteárico e analisar a degradabilidade *in situ* e *in vitro* constatou uma efetividade na proteção *in situ* de 73,5% no tempo 12 horas, porém essa, caiu para 41,8% no tempo 24 horas. Entretanto nesse estudo obteve-se uma efetividade em média de 93,3% no tempo 12 horas, e 87,56% no tempo 24 horas para a 2:1, enquanto que para a 4:1 a proteção foi de 96,12% e 94,05% nos respectivos tempos.

A Figura 1 a seguir mostra as curvas de degradabilidade de todos os materiais incubados no rúmen dos animais nos respectivos tempos, a metionina livre, a curva é crescente, sendo logo no tempo 3 horas, atingindo mais de 73% de degradabilidade, isto porque os aminoácidos essenciais quando disponíveis no rúmen são rapidamente degradados e utilizados pelas bactérias proteolíticas (Santos, 2006).

Conforme esperado, a cera de carnaúba não apresentou degradabilidade no tempo máximo de 72 h, confirmando ser um material inerte ao ataque da microbiota ruminal.

Alguns lipídios não sofrem o processo de fermentação via rúmen, e podem passar inerte sem alterações, no entanto alguns ocorre o processo de hidrólise e biohidrogenação, sendo utilizados pelos microrganismos como fonte de energia (Berchielli, 2006). Nesse estudo não houve nenhum dos processos citados, sendo a cera de carnaúba um lipídio que não sofre a ação dos microrganismos.

No entanto a degradabilidade observada nesse estudo (Figura 1), foi relativamente baixa quando comparadas a outros estudos utilizando lipídios como protetor para aminoácidos. Bueno et al (2003), Koenig e Rode (2001), obtiveram valores semelhantes da efetividade da proteção da metionina (24 horas) em torno de 41,8%, enquanto que nesse estudo obteve-se 87,56% para 2:1 e 94,05% para 4:1, como pode ser observado na Figura 1.

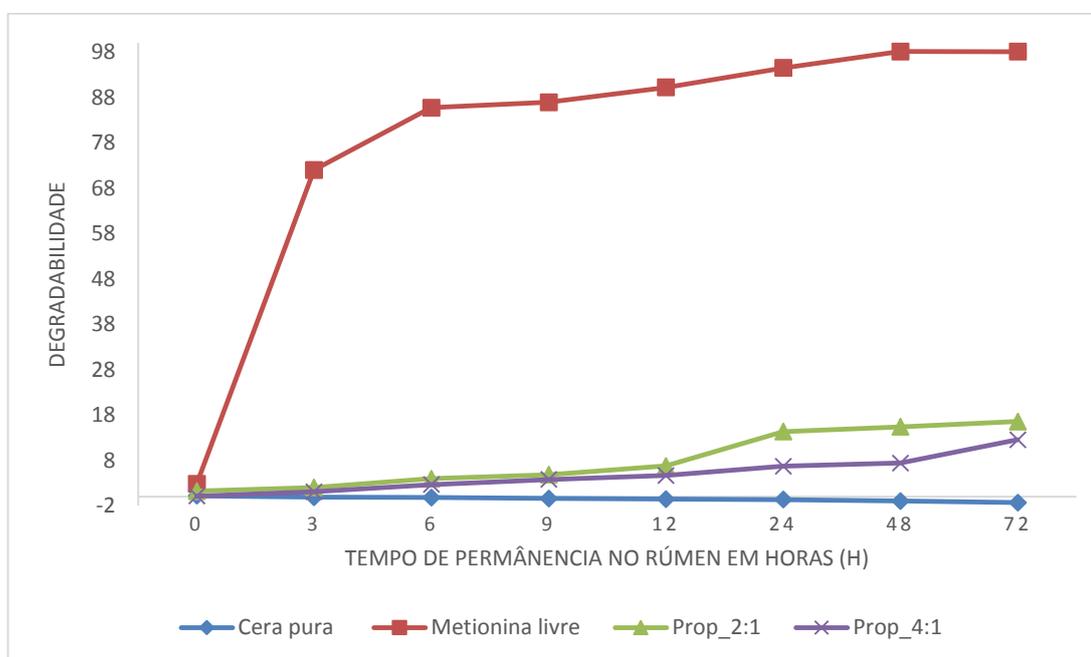


Figura 1. Degradabilidade Potencial (DP) dos produtos avaliados, em função do tempo de permanência no rúmen (h). (♦ cera pura, ■ metionina livre, ▲ Pro_2:1, x Prop_4:1).

3.2. Perfil de liberação de nitrogênio

Os valores obtidos em cada fração (a, b, c e i), degradabilidade efetiva e potencial da proteína bruta estão expostos na Tabela 3. Houve diferença significativa em todas as frações estudadas ($P < 0,05$), além da degradabilidade efetiva e potencial para os dois sistemas.

Ao verificar os dados abaixo observa-se um baixo potencial de degradabilidade, da proteína bruta, fração b, sendo a fração i, acima de 90% para os dois sistemas. A degradabilidade efetiva e potencial dos dois sistemas foram em média 4,35% e 9,5% (prop_2:1),

2% e 5,07% (prop_4:1), valores relativamente baixos, demonstrando a eficiência da proteção do núcleo.

Tabela 4. Estimativas da fração solúvel inicial (a), fração insolúvel potencialmente degradável (b), fração indigerível (c), fração potencialmente indegradada (i), degradação efetiva (DE) e degradação potencial (DP) da proteína bruta

Tratamentos	A(%)	B (%)	C (%)	I (%)	DP	DE	R ²
Prop_2:1	0,36 ^a	9,16 ^a	0,0468 ^a	90,47 ^a	9,54 ^a	4,35 ^a	0,91
Prop_4:1	0,06 ^b	5,01 ^b	0,0249 ^b	94,97 ^b	5,07 ^b	2,0 ^b	0,92

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem ao teste de Tukey com 5% de probabilidade;

Na Tabela 3, é possível observar a degradabilidade potencial da proteína bruta nos respectivos tempos, verificando-se diferença significativa ($P < 0,05$) em todos os tempos entre as duas formulações, destacando que a prop_4:1 teve menor perda de proteína bruta, sendo, portanto, mais eficiente o processo de microencapsulação, o maior tempo (72 h), a média para a prop_2:1 foi de 9,035% e para a prop_4:1, 4,2%, confirmando alta eficiência de proteção da prop_4:1.

Tabela 5. Degradabilidade potencial da proteína bruta (PB) das duas proporções 2:1 e 4:1 nos respectivos tempos (% H)

Tratamentos	TEMPOS							R ²
	3	6	9	12	24	48	72	
Prop_2:1	2,28 ^a	3,21 ^a	4,01 ^a	4,69 ^a	6,62 ^a	8,38 ^a	9,04 ^a	0,96
Prop_4:1	1,08 ^b	1,36 ^b	1,61 ^b	1,85 ^b	2,62 ^b	3,63 ^b	4,20 ^b	0,97

Médias seguidas de letras iguais na mesma coluna, não diferem ao teste de Tukey com 5% de probabilidade;

De acordo a (NRC, 2001), a proteção de aminoácidos com polímeros sensíveis a pH, proporciona uma elevada proteção da ação de microrganismo ruminais com boa liberação intestinal, sendo, tal proteção, um sistema independente de função enzimática, dependente apenas das diversidades do pH, entre rúmen e abomaso.

Os polímeros são considerados a mais efetiva tecnologia usada para proteção dos aminoácidos, entre 70 e 80% de proteção dos microrganismos ruminais (Lee, 2012). A proteção com matriz lipídica permite um grau razoável de proteção da ação dos microrganismos ruminais (NRC, 2001).

Entretanto, nesse estudo obteve-se um elevado grau de proteção no núcleo (metionina) utilizado matriz lipídica (cera de carnaúba tipo I). A degradabilidade efetiva e potencial foram de 4,35%, 9,5% e 2%, 5,07% para prop_2:1 e prop_4:1 respectivamente (Tabela 3), ou seja,

baixa degradação da proteína bruta, além disso a efetividade da proteção do núcleo foi de 91% para a prop_2:1 e 95,8% para a prop_4:1, (Tabela 4), resultados que contradizem Melo (2006) e a NRC (2001).

A curva de liberação de nitrogênio ocorreu de maneira semelhante para os dois sistemas, porém em quantidade diferentes, (Figura 2).

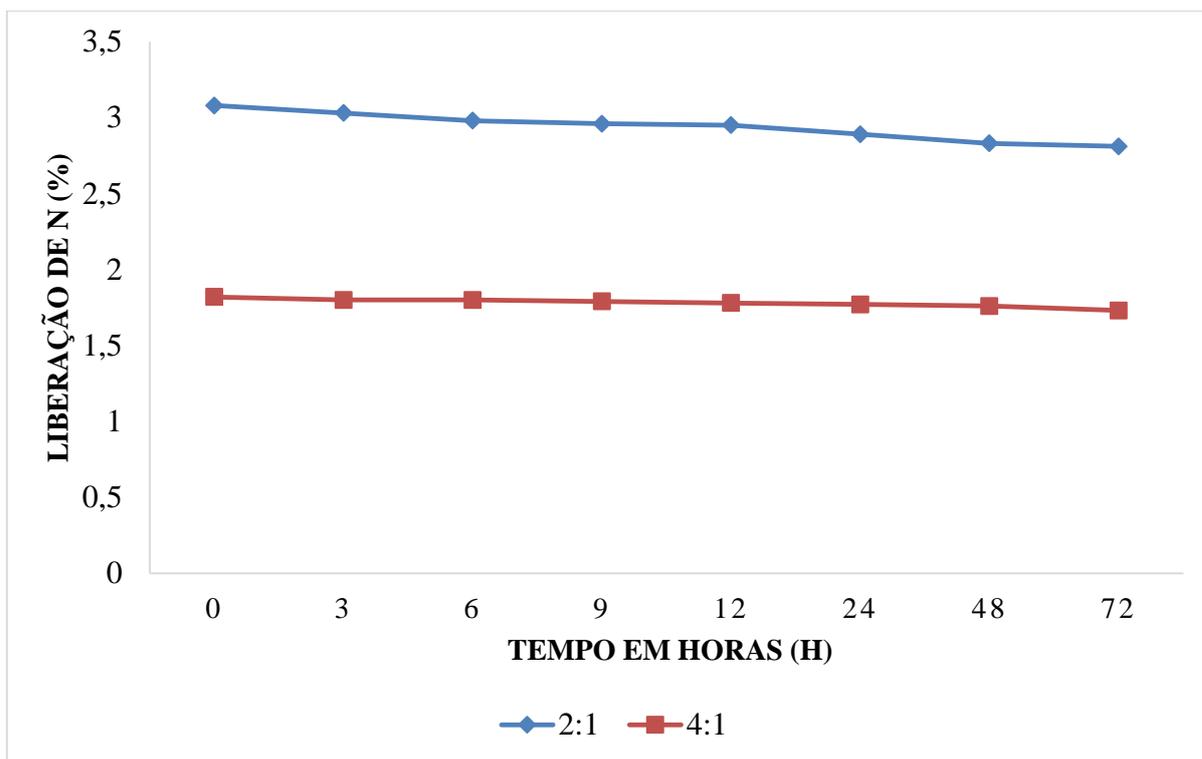


Figura 2. Perfis de liberação do Nitrogênio dos dois sistemas microencapsulados, 2:1 e 4:1, em função do tempo.

A curva segue em forma decrescente em função do tempo, onde a diferença entre o tempo zero e 72 horas foi apenas de 8,7% e 4,9% de perda para 2:1 e 4:1 respectivamente, os núcleos das duas formulações mantiveram-se em mais de 90%, destacando a 4:1, onde a conservação do núcleo no período de até 72 horas foi de acima de 95%.

Nogueira et al. (2015) em estudo utilizando ureia protegida com polímero (UP) e carbonato de cálcio (UCC) de liberação lenta, observou baixa liberação de nitrogênio, com destaque para o UCC, onde obteve 60% de efetividade da proteção em 24 horas. Ribeiro et al (2011), Chegene (2013), Paula et al., (2009), revestiram ureia com polímero para liberação controlada, os mesmos obtiveram resultados semelhantes, de 1 a 4 horas com alta grau de liberação de nitrogênio e estabilidade a partir das 9 horas. Nesse estudo, os resultados atestam que foi possível manter uma menor taxa de liberação ao longo de todo o intervalo de tempo

investigado., demonstrando a eficácia do método de microencapsulação com matriz lipídica (Figura 2).

3.3. Avaliação da ocorrência de biodegradação por microscopia eletrônica MEV

As micrografias eletrônicas de varredura foram obtidas para as formulações 2:1 e 4:1 no tempo 72 horas, pós teste *in situ* (Figuras 3 e 4).

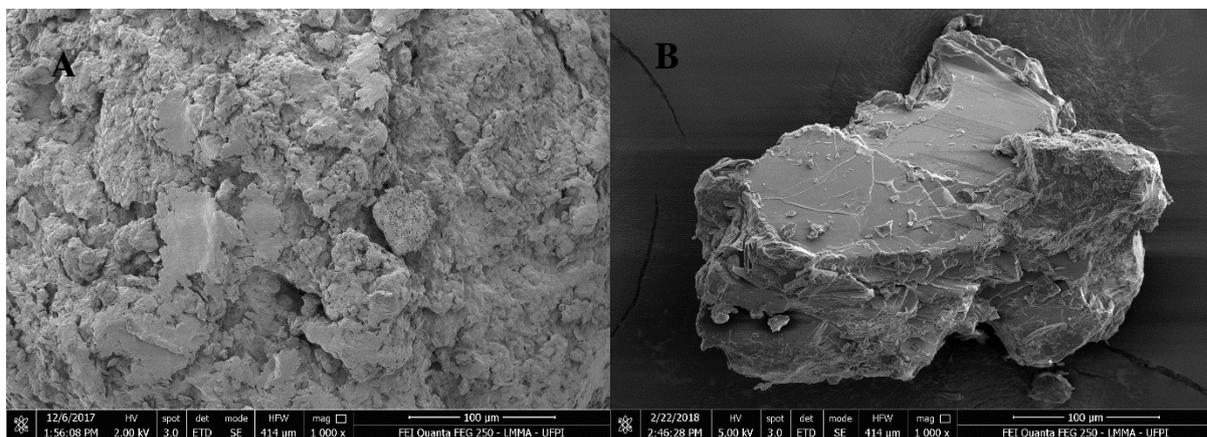


Figura 3. Micrografia da formulação 2:1 obtida antes (direita) e após o teste *in situ* (esquerda).

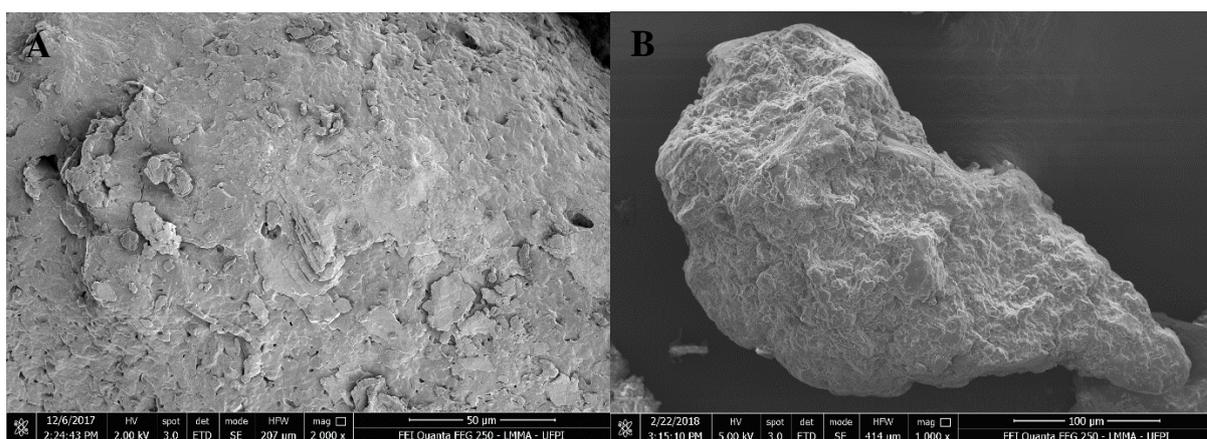


Figura 4. Micrografia da formulação 4:1 obtida antes (direita) e após o teste *in situ* (esquerda).

Foram escolhidas as imagens que melhor representaram cada formulação e comparadas com as micrografias realizadas antes da degradabilidade. As micrografias antes e após degradabilidade nas duas formulações 2: 1 e 4:1, não houve diferença entre ambas, ou seja, as micrografias após teste *in situ* não apresentaram sinais de biodegradação, mantendo assim sua integridade, reforçado a justificativa de que a cera realmente é um produto pelo qual protege o aminoácido da ação de microrganismos. Entretanto, o tempo 72 horas houve uma perda de nitrogênio em média de 8% e 5% nas prop_2:1 e 4:1 respectivamente, essa perda pode ser atribuída a quantidade de aminoácidos que ficaram na superfície dos microencapsulados, pelo qual foram utilizados pelos microrganismos, mantendo o núcleo intacto. De acordo Lopes (2005), a biodegradação e difusão são os meios pelo o qual os microrganismos ruminais

degradam materiais encapsulados em matriz lipídicas, ocorrendo sempre um meio que prevalece sobre o outro, entretanto nesse estudo não houve nenhum desses meios usados pelos microrganismos, o material manteve sua integridade até o tempo 72 horas.

4. Conclusão

A técnica de microencapsulação utilizada (*Melt emulsification*) apresentou-se adequada, propiciando altos rendimentos, além de ser um método barato, rápido e de simples execução. A cera de carnaúba mostrou-se eficaz como agente encapsulante para metionina, com alta retenção deste núcleo, oferecendo proteção frente aos microrganismos ruminais, menor degradação e conseqüentemente, absorção a nível intestinal, diminuindo desvantagens financeiras e nutricionais do uso direto deste aminoácido. Ambas as formulações investigadas apresentaram resultados promissores, com destaque para a formulação 4:1.

Referências

- ACOSTA, E. S.; CERRILLA, M. E. O.; MARTÍNEZ, G. M.; VALDEZ, O. D. M.; DIOS, S. E. B. Rastrojo de maíz tratado con urea y metionina protegida en dietas para ovinos en crecimiento. **Interciencia**, v. 37, n. 5, p. 395-399, 2012.
- AOAC, **Association of Analytical Chemists. Official Methods of Analysis**. 14th Edition Washington DC, 1984.
- BERCHIELLI, T.T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.
- BUENO, A. L.; MARTINEZ, G. D. M.; GAMA, J. R. B; PALENCIA. L.L.L; ESQUEBA. M.T. S; BOJALIL, C. M. G; OSEGUERA, J. A. Degradabilidad ruminal in situ e in vitro de la metionina protegida. **Técnica Pecuaria en México** v.41, n.1, p.91-103, 2003.
- CABRITA, A. R. J., DEWHURST, R. J., MELO, D. S. P., MOORBY, J. M., FONSECA, A. J. M “Effects of dietary protein concentration and balance of absorbable amino acids on productive responses of dairy cows fed corn silage-based diets” **Journal of Dairy Science**, v, 94, p. 4647–4656, 2011.
- CHEGENI, A.; LI, Y.L.; DENG, K.D.; JIANG, C.G.; DIAO, Q.Y. Effect of dietary polymer-coated urea and sodium bentonite on digestibility, rumen fermentation, and microbial protein yield in sheep fed high levels of corn stalk. **Livestock Science**, v.157 p.141–150, 2013.

- DETMANN, Edenio, et al. **Métodos para análise de alimentos – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco, MG: Suprema, 2012.
- FREIRE, L. D. R., MOREIRA, B. S., PEREIRA, M. M., FERREIRA, D. N., DOS SANTOS, E. D. J., DOS SANTOS PEDREIRA, M., DE MIRANDA PEIXOTO, C. A. Uréia de Liberação Lenta em Dietas de Ovinos Confinados: Síntese de Proteína Microbiana. **Revista Científica de Produção Animal**, v.14, n. 2, p.219-222, 2014.
- KOENIG, K. M.; RODE, L. M. Ruminant degradability, intestinal disappearance, and plasma methionine response of rumen-protected methionine in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 6, p. 1480-1487, 2001.
- LEE, C., HRISTOV, A. N., CASSIDY, T. W., HEYLER, K. S., LAPIERRE, H., VARGA, G. A., PARYS, C. “Rumen-protected lysine, methionine, and histidine increase milk protein yield in dairy cows fed a metabolizable protein-deficient diet” **Journal of Dairy Science** v. 95, n. 10, p. 6042-6056, 2012
- LEE, C., GIALLONGO, F., HRISTOV, A. N., LAPIERRE, H., CASSIDY, T. W., HEYLER, K. S. & PARYS, C. “Effect of dietary protein level and rumen-protected amino acid supplementation on amino acid utilization for milk protein in lactating dairy cows” **Journal of Dairy Science** v. 98, n. 3, p. 1885-1902, 2015
- 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.
- MCDONALD P.; EDWARDS, R, A.; GREENHALGH, J.F.D.; MORGAN, C.A.; SINCLAIR, L.A.; WILKINSON, R.G.; **Animal Nutrition**, Pearson, 7a ed, 53 – 58, 2010
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washinton, D.C.: 2001. 381p.
- National Research Council. “Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition” **National Academy of Sciences**, No. 3. National academies, 2001.
- NOGUERA, R. R.; POSADA, S. L.; RESTREPO, C. I. Comparação de fontes de ureia de lenta liberação sobre a degradação in vitro do capim King grass (*Pennisetum purpureum* x *Pennisetum typhoides*). **Livestock Research for Rural Development**, v. 27, p. 11, 2015.

- ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agricultural Science**, v. 92, p. 449-453, 1979.
- PAULA, A.A.G.; FERREIRA, R.N.; ORSINE, G.F.; GUIMARÃES, L.O.; OLIVEIRA, E.R. Ureia polímero e ureia pecuária como fontes de nitrogênio sóluvel no rúmen: parâmetros ruminal e plasmático. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 2009.
- PRADO, T. F. "**Metionina protegida, lisina protegida, enzima amilolítica e lisofosfolipídeos em dieta de alto concentrado para cordeiros confinados.**" Dissertação UFGO, 75p. (2013).
- RIBEIRO, S.S.; VASCONCELOS, J.T.; MORAIS, M.G.; ÍTAVO, C.B.C.F.; FRANCO, G.L. Effects of ruminal infusion of a slow-release polymer-coated urea or conventional urea on apparent nutrient digestibility, in situ degradability, and rumen parameters in cattle fed low-quality hay. **Animal Feed Science and Technology** v.164, p.53-6, 2011.
- SANTOS, F.A.P. **Metabolismo das proteínas** In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. Nutrição de ruminantes. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 583p.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de aminoácidos protegidos na dieta de ruminantes é uma excelente alternativa para maximizar a produção, em destaque a produção de ruminantes onde a exigência de metionina e lisina é bastante alta. O uso da cera de carnaúba como agente encapsulante para metionina mostrou-se eficaz na proteção deste aminoácido, protegendo-o da degradação ruminal. Vale salientar a importância de continuar e aprofundar as investigações em relação à disponibilidade do material microencapsulado no abomaso, ou seja, a proteção do mesmo foi muito eficaz via rúmen, porém sua digestibilidade no abomaso precisa ser averiguada, uma vez que, por ser um material lipídico (hidrofóbico), sofre influência do pH e da ação de enzimas presentes nesse órgão.