

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Estudo *In Vitro* de Nanocompósitos para a Liberação Lenta de Nitrogênio Sobre a Alimentação Animal”**

**Camila Conceição Tomé da Cruz\***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA.

**Orientador: Caue Ribeiro de Oliveira**

**\* bolsista CNPq**

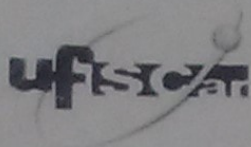
**São Carlos - SP  
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C957e Cruz, Camila Conceição Tomé da  
Estudo In Vitro de Nanocompósitos para a Liberação Lenta de Nitrogênio Sobre a Alimentação Animal / Camila Conceição Tomé da Cruz. -- São Carlos : UFSCar, 2016.  
59 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Liberação lenta. 2. Ureia . 3. Alimentação de ruminantes. 4. Forragem de baixa qualidade. 5. Suplementação com nitrogênio não proteico. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

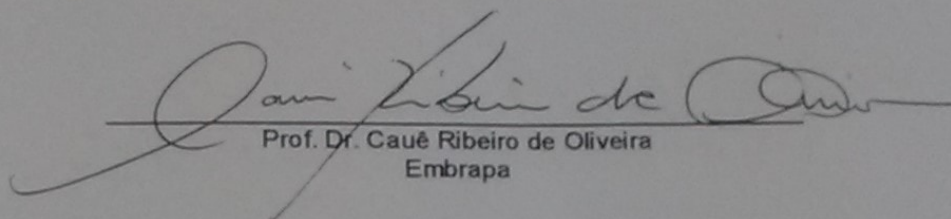
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Química

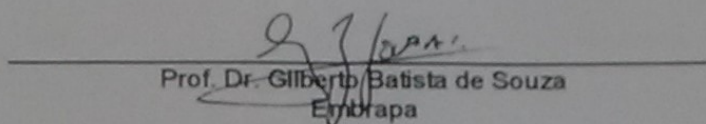
---

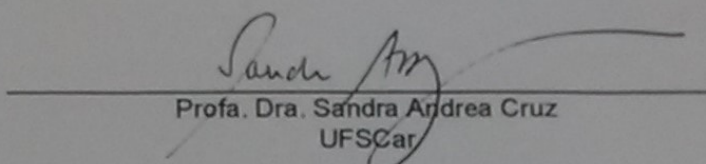
Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Camila Conceição Tomé da Cruz, realizada em 29/03/2016:

  
Prof. Dr. Cauê Ribeiro de Oliveira  
Embrapa

  
Prof. Dr. Gilberto Batista de Souza  
Embrapa

  
Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz  
UFSCar

# AGRADECIMENTOS

*Dedico esta dissertação à minha família  
e amigos pelo apoio e incentivo.*

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> Composição química em percentagem dos nanocompósitos obtidos pelo processo de extrusão.....	14
<b>Tabela 3.2</b> Composição da Cana de açúcar utilizada no teste de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca.....	21
<b>Tabela 3.3</b> Composição da solução tampão preparada para o teste de digestibilidade <i>in vitro</i> .....	23
<b>Tabela 4.1</b> Resíduo final em massa (%) após a análise termogravimétrica.....	36
<b>Tabela 4.2</b> Análise elementar , percentagens dos elementos C, N e H para ureia pura, MMT, HG e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2, MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf. ....	38
<b>Tabela 4.3</b> Resultados em percentagem da digestibilidade da cana de açúcar em função do tempo do teste de digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca.....	43

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Ciclo do nitrogênio não proteico e produção de proteína microbiana no rúmen.....	7
<b>Figura 1.2. a)</b> Tetraedros $ZO_4$ (onde $Z = Si, Al$ ) unidos pelo compartilhamento de átomos de oxigênio basais, formando a lâmina tetraedral; <b>b)</b> Octaedros de $YO_6$ (onde $Y = Al, O, OH$ ) unidos pelo compartilhamento de arestas, formando lâminas octaedrais..	10
<b>Figura 1.3</b> Esboço da estrutura 2:1, da montmorilonita.....	11
<b>Figura 3.1</b> Desenho esquemático do processo de extrusão, com a obtenção dos materiais nanocompósitos. ....	15
<b>Figura 3.2</b> Esquema ilustrativo do teste de liberação em meio aquoso realizado em Incubadora refrigerada. ....	18
<b>Figura 3.3</b> - Curva analítica de ureia utilizada no teste de liberação.....	19
<b>Figura 3.4</b> Imagem dos nanocompósitos moídos. (a) tamanho real; (b) imagem no microscópio. ....	20
<b>Figura 3.5</b> Coleta e filtragem do líquido ruminal utilizado no teste de digestibilidade in vitro da matéria seca. ....	22
<b>Figura 3.6</b> Filtros F57 (saquinhos) contendo amostra selada, utilizados no teste de digestibilidade.....	23
<b>Figura 3.7</b> Ilustração do teste de digestibilidade In Vitro da Matéria Seca.....	24
<b>Figura 3.8</b> Equipamentos e reagentes utilizados na determinação da concentração de amônia durante o teste de digestibilidade por análise por ingestão em fluxo. ....	26
<b>Figura 3.9</b> Curva Analítica, concentração de amônio versus absorvância, leitura por método espectrofotométrico.....	29

<b>Figura 4.1</b> Difractometria de Raios-X para montmorilonita pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2, MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf. a) DRX 2 com varredura de 3 a 40 °C, b) aproximação da região $d_{001}$ de 5 a 10°C.....	30
<b>Figura 4.2</b> Micrografias obtidas por MEV da ureia pura moída, montmorilonita pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2, MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf. ....	31
<b>Figura 4.3</b> Imagens de EDX para os materiais nanocompósitos, identificação dos elementos C, N, O, Mg, Al, Si nas regiões.....	34
<b>Figura 4.4</b> Curva Termogravimétrica (a) da MMT pura, ureia pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2 e MMT/Ur 1:4 (b) da MMT pura, ureia pura, HG puro, Pf puro e nanocompósitos da MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf. ....	35
<b>Figura 4.5</b> Derivada da Curva Termogravimétrica (a) da MMT pura, ureia pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2 e MMT/Ur 1:4; (b) da MMT pura, ureia pura, HG puro, Pf puro e nanocompósitos da MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf. ....	36
<b>Figura 4.6</b> Percentual de ureia liberada em função do tempo para ureia pura e nanocompósitos em função do tempo, em pH neutro e Temperatura de 25°C. .	40
<b>Figura 4.7</b> Imagens dos grânulos dos nanocompósitos após 120 h de experimento de liberação. ....	40
<b>Figura 4.8</b> Digestibilidade microbiana, obtida do teste de digestibilidade in vitro da matéria seca, para cana pura, e a cana acrescida dos materiais nanocompósitos e ureia pura.....	41
<b>Figura 4.9</b> Ganho de digestibilidade na digestão da matéria seca da cana de açúcar para cana acrescida dos nanocompósitos, MMT e ureia pura.....	44
<b>Figura 4.10</b> Análise estatística do teste de digestibilidade: (a) media da constante (b) média do Beta.....	45

<b>Figura 4.11</b> Análise estatística da digestibilidade do último ponto para cana de açúcar pura e quando suplementada com ureia pura, MMT pura e nanocompósitos.....	46
<b>Figura 4.12</b> Concentração de amônia (mg/L) durante o teste de digestibilidade para cana pura, e cana acrescida de ureia pura, mmt pura e nanocompósitos em função do tempo. ....	48
<b>Figura 4.13</b> Valor de pH durante o teste de digestibilidade para cana pura, e cana acrescida de ureia pura, mmt pura e nanocompósitos em função do tempo. ....	50
<b>Figura 4.14</b> Concentração de NH <sub>3</sub> (ppm) no ensaio de inibição de uréase, controle (material sem adição de MMT), 20% MMT e 50% de MMT.....	51



## RESUMO

“ESTUDO *IN VITRO* DE NANOCOMPÓSITOS PARA A LIBERAÇÃO LENTA DE NITROGÊNIO SOBRE A ALIMENTAÇÃO ANIMAL”: A suplementação com nitrogênio não proteico (NNP) vem sendo muito utilizada na alimentação de ruminantes em dietas com volumosos de baixa qualidade. Isto porque estes animais possuem uma série de microrganismos no rumem capazes de utilizar amônia ( $\text{NH}_3$ ) para produção de proteína microbiana de excelente qualidade. Essa amônia utilizada pode ser obtida através da ação da enzima urease sobre os produtos nitrogenados fornecidos na alimentação, como por exemplo, a ureia. No entanto, um consumo excessivo de ureia pode resultar em intoxicação por  $\text{NH}_3$ . Assim, uma liberação controlada de ureia no rúmen é um aspecto essencial na alimentação de ruminantes, porém poucos estudos relacionados ao controle da liberação de ureia no rúmen foram identificados até o momento. Com isso esse trabalho propõe a obtenção de nanocompósitos de montmorilonita e ureia com ou sem a adição de compostos poliméricos (paraformaldeído e hidrogel), formulados pelo processo de extrusão, como fonte de liberação lenta de nitrogênio não proteico sobre a alimentação animal. Os materiais foram caracterizados por Difractometria de raios-X (DRX), Microscopia eletrônica de Varredura (MEV), Análise termogravimétrica (TG) e Análise elementar (CHN). Estudou-se também o comportamento de solubilização em meio aquoso da ureia presente nos nanocompósitos. Dos resultados de caracterização pode-se observar que a montmorillonita sofreu intercalação em todos os nanocompósitos, a ureia atuou como fase dispersa em uma matriz de montmorillonita. Os resultados de liberação mostraram que a presença da MMT atua como barreira na liberação de ureia fazendo com que todos os nanocompósitos tenham liberação mais lenta de ureia em relação ao material puro. A fim de avaliar o efeito da utilização desses nanocompósitos como suplemento de nitrogênio não proteico para a cana de açúcar, realizou-se o teste de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, para melhorar a digestibilidade da cana de açúcar. Diferentes nanocompósitos apresentaram ganho sobre a digestibilidade da cana de açúcar, que é considerada uma forragem de baixa qualidade, principalmente por apresentar baixo valor proteico e ser de difícil digestão. O nanocompósito MMT/Ur 1:4/HG foi o mais eficaz no aumento da digestibilidade da cana de açúcar. O incremento sobre a digestibilidade não foi muito expressivo para os nanocompósitos com liberação de ureia muito lenta, o que sugere que uma taxa de liberação ideal é necessária, esta idealidade estaria relacionada a sincronização de energia proveniente dos carboidratos ingeridos na dieta e a concentração de amônia disponível, uma vez que ambos são utilizados na síntese proteica e ambas influenciam na digestão

dos alimentos. O valor de pH manteve-se dentro de uma faixa ideal para atividade da urease. Estes resultados mostram que o desenvolvimento de nanoestruturas é uma ferramenta poderosa para incrementar a eficiência de forragens convencionais, e pode servir como base para futuros ensaios *in vivo*.

**Palavras chave:** Liberação lenta, ureia, Alimentação de ruminantes, Forragem de baixa qualidade, Suplementação com nitrogênio não proteico.

## ABSTRACT

"STUDY *IN VITRO* OF NANOCOMPOSITES FOR THE SLOW RELEASE OF NITROGEN ABOUT THE ANIMAL FEED": Supplementation with non-protein nitrogen (NPN) has been widely used in ruminant feeding in diets of low quality forages. This is because these animals have a number of microorganisms in the rumen able to use ammonia for microbial protein production of excellent quality, ammonia is obtained through the action of urease enzyme on the nitrogenous products supplied in food, for example, urea. However, an excessive consumption of urea may result in poisoning by  $\text{NH}_3$ . Thus, a controlled release of urea into the rumen is an essential aspect for ruminants feed, but few studies to control the release of urea in the rumen have been identified to date. Thus this paper proposes obtaining nanocomposites montmorillonite and urea, formulated by the extrusion process, as a source of slow-release nonprotein nitrogen on the feed. The materials were characterized by diffraction of X-ray (XRD), scanning electron microscopy (SEM), thermal gravimetric analysis (TGA) and elemental analysis (CHN). Also was studied the behavior solubilization in an aqueous medium of urea present in the nanocomposites. Characterization results can be observed that the montmorillonite exfoliation suffered in all nanocomposites, urea served as montmorillonite dispersed phase in a matrix. The release results showed that the presence of MMT acts as a barrier to release of urea making all nanocomposites have slower release of urea compared to the pure material. In order to assess the effect of the use of such nanocomposites as non-protein nitrogen supplement for sugarcane (bulky), was carried out *in vitro* digestibility test for dry matter, which simulates the food digestion conditions in the rumen. Different nanocomposite showed gain on the digestibility of sugar cane, which is considered low quality forage, especially for presenting low protein value and be difficult to digest. The nanocomposite MMT/Ur 1:4/HG 2% was the most effective in increasing the digestibility of the sugar cane. The gain on

digestibility was not very significant for displaying nanocomposites release kinetics urea very slowly, suggesting that an ideal release rate is required, being synchronized with the power supply supplied from the carbohydrate in the diet. The pH remained within the optimal range for urease activity, the enzyme responsible for metabolizing urea to ammonia and also for maximum microbial synthesis. These results show that the development of nanostructures is a powerful tool for increasing the efficiency of conventional fodder, and can serve as a basis for further in vivo testing.

**Keywords:** Slow-release urea, Ruminants feeding, Low quality forages, Non-protein nitrogen supplementation.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Valor nutritivo das pastagens e digestibilidade.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Suportes forrageiros - cana de açúcar.....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Nitrogênio não proteico (NNP) .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 Ciclo da ureia e produção-proteína bacteriana.....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.2 Intoxicação por NH<sub>3</sub>.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.3 Liberação lenta de NNP.....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Argilominerais de montmorilonita .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>13</b>
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2 Preparação dos compósitos .....</b>	<b>13</b>
<b>3.3 Caracterizações.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.1 Difractometria de raios X (DRX) .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDX) .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.3 Análise Termogravimétrica (TGA) .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3.4 Análise elementar (CHN) .....</b>	<b>17</b>
<b>3.4 Avaliação da liberação de ureia em água .....</b>	<b>17</b>
<b>3.5 Teste de Digestibilidade <i>in Vitro</i> da MatériaSeca.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6 Inibição da uréase.....</b>	<b>27</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>52</b>

<b>6. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES AO TRABALHO DE MESTRADO.....</b>	<b>54</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>55</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

O bom desenvolvimento e, conseqüentemente, a boa produtividade dos ruminantes está associada a uma dieta adequada (DEMMENT & GREENWOOD, 1988). No cenário nacional, grandes partes das regiões apresentam uma boa vegetação e/ou pastagem nos períodos chuvosos, capazes de fornecer o alimento em quantidade e qualidade adequados para o ganho de peso do animal. Porém, em épocas de estiagem ocorre um déficit na quantidade e na qualidade da forragem disponível, gerando a necessidade da suplementação dos alimentos na forma de silagens, feno entre outros. A queda no volume de matéria seca total e o aumento da fração fibrosa (lignina) dificultam o aproveitamento do alimento pelos microrganismos, diminuindo assim o teor de proteína produzido. Esses fatores refletem negativamente no desempenho dos animais, podendo ocasionar o aumento do trabalho de degradação no rúmen, redução da população de bactérias, lentidão na taxa de passagem dos alimentos, menor consumo, perdas de peso e menor taxa de prenhez (ZONTA & ZONTA, 2011; TOWNSEND et al.,1998). Dessa forma, nesse período buscam-se alternativas alimentares capazes de fornecer os nutrientes adequados na alimentação animal.

A cana de açúcar vem sendo utilizada como suporte forrageiro em períodos de estiagem. Dentre as vantagens do uso desse alimento estão à alta produtividade de matéria seca, um corte ao ano que geralmente coincide com o período de escassez da pastagem, além de apresentar um valor nutritivo constante. Porém, o uso exclusivo da cana de açúcar como volumoso nas dietas é limitado pela sua composição bromatológica que apresenta baixo valor proteico, fazendo com que seja considerado um volumoso de baixa qualidade. O teor proteico é um dos maiores limitantes para adoção da cana de açúcar como volumoso para os ruminantes. (SIQUEIRA et al., 2012)

Uma das maneiras de se corrigir dietas a base de cana de açúcar é a suplementação com nitrogênio não proteico (NNP). Isto é possível, devido às características anatomofisiológicas do estômago dos ruminantes, sendo o único animal capaz de converter nitrogênio não proteico em proteína de excelente qualidade (COELHO da SILVA & LEÃO, 1979; NOCEK & RUSSELL, 1988; CALSAMIGLIA et al., 2008). Assim, a suplementação alimentar desses animais com nitrogênio de fontes não proteicas de alta degradabilidade ruminal tem sido utilizada para corrigir dietas desbalanceadas (REID, 1953).

De acordo com MAYNARD et al., (1984) existe uma variedade de compostos que são utilizados para o fornecimento de NNP, tais como, biureto, ácido úrico, sais de amônio e nitratos, e ureia. Dentre esses compostos, a ureia têm se destacado devido ao baixo custo econômico, disponibilidade, fácil manuseio e aplicação (KERTZ, 2010).

No entanto, o consumo excessivo de ureia e o baixo teor de carboidratos fermentáveis podem resultar em casos de intoxicação por  $\text{NH}_3$  (SATTER & ROFFLER, 1979). Os altos níveis de ureia também têm impacto ambiental, porque é um indicativo que mais nitrogênio está sendo excretado no esterco e na urina, contribuindo para o aumento de problemas na qualidade da água, mau cheiro e gases exalados pelos dejetos (CHERDTHONG & WANAPAT, 2010). Uma alternativa que vem sendo estudada para contornar os problemas de intoxicação e de impactos ambientais é a utilização de materiais de liberação lenta de ureia. Esses materiais buscam minimizar os riscos de intoxicação por amônia e aumentar a digestibilidade de suplementos de baixa qualidade, pois aumentam a microbiota, responsável por parte da digestão do alimento e conseqüentemente tornando-os mais eficientes na nutrição animal.



## **1.1 - Valor nutritivo das pastagens e digestibilidade**

O sistema de produção via pasto e ou/forragem constitui a base da dieta alimentar dos ruminantes na grande maioria das regiões tropicais. As variações de qualidade desses alimentos são dependentes de vários fatores, tais como: gênero, espécie, cultivares, ainda pode variar de acordo com as partes das plantas, estágio de maturidade, fertilidade do solo e com as condições locais e estacionais. A eficiência da utilização destas plantas forrageiras pelos animais está na dependência de vários fatores, entre os quais podemos citar como mais significativas a qualidade e a quantidade de forragem disponível na pastagem e o potencial de uso pelo animal.

A composição das forragens pode ser dividida em duas categorias: a primeira denomina-se parede celular. Os componentes da parede celular incluem em sua maior parte carboidratos, celulose, hemicelulose e lignina que possuem variação no comportamento de digestibilidade. A segunda é o conteúdo celular, sendo composto por substâncias solúveis em água ou levemente solúveis em água, tais como: amido, lipídios e algumas proteínas que são digeridas tanto por enzimas de microrganismos, quanto por aquelas secretadas pelo aparelho digestivo dos animais. Como são mais digeríveis tornam o conteúdo celular de maior disponibilidade (VAN SOEST, 1994).

A digestibilidade dos alimentos é um parâmetro muito importante, pois esta diretamente relacionada com a disponibilidade dos nutrientes para os animais. Ela pode ser definida como a medida da proporção em que o alimento consumido é digerido e metabolizado pelo animal. Os componentes tanto da parede celular quanto do conteúdo celular possuem potencial para total digestão, mas isso não ocorre devido às ligações de hemicelulose e celulose pela lignina, que tem efeito protetor contra a ação dos microrganismos do rúmen (REIS et. al., 1993).

A velocidade de degradação da forragem no rúmen, não depende apenas de sua composição química, sendo também dependente dos tamanhos de partícula que influenciam diretamente na velocidade de passagem dos alimentos. A velocidade de degradação é o fator mais importante na determinação do consumo de forragens de baixa qualidade. Pode ser amplamente favorecida por adequados níveis de compostos de nitrogênio, minerais e de ácidos graxos de cadeia longa, que atuam possivelmente melhorando as condições para o desenvolvimento da flora microbiana, que se torna mais ativa no processo de fermentação das forragens. (CORSI, 1986)

A digestibilidade pode ser determinada por métodos "*in vivo*", "*in situ*" e "*in vitro*". O método *in vitro*, conhecido como digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), vem sendo amplamente utilizado em razão dos custos mais reduzidos, rapidez, e boa correlação com o método *in vivo*, tem sido bastante utilizado para a avaliação da qualidade das forragens (PEREZ, 1997).

## **1.2 - Suportes forrageiros – cana-de-açúcar**

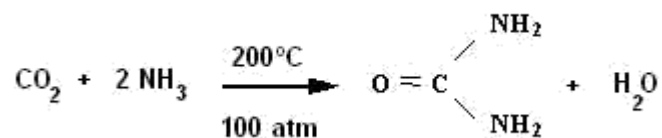
A cana-de-açúcar é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, própria de climas tropicais e subtropicais, possivelmente originária do sudeste da Oceania. Atualmente é considerada como uma das culturas de maior importância socioeconômica para o Brasil tendo como principais derivados: o açúcar e o etanol. Além desses produtos, a cana seca e moída, e o bagaço da cana são utilizados também na alimentação animal (PEREIRA et al, 2008). Dentre as vantagens de seu uso estão: a elevada produção de matéria seca, uma cultura relativamente fácil de conduzir, tem boa aceitação pelos animais, apresenta elevado teor de carboidratos solúveis e disponibilidade no período seco, sem que haja queda no seu valor nutritivo (CARVALHO, 1992). Porém, a cana-de-açúcar apresenta características que limitam a sua utilização,

tais como: baixo teor de proteína bruta, fibra de lenta degradação ruminal e elevado teor de fibra não degradável, o que pode limitar sua ingestão como alimento exclusivo na dieta (PEREIRA et al., 2001). Contudo, na entressafra, ela atinge a maturidade apresentando maior valor nutritivo, devido ao acúmulo de açúcares em seus tecidos, compensando a diminuição da digestibilidade da parede celular (BANDA & VALDEZ, 1976).

### 1.3 - Nitrogênio não proteico (NNP)

De acordo com SANTOS et al. (2001), existe uma variedade de compostos NNP, como sais de amônio e nitratos, e ureia, que têm se destacado devido ao baixo custo econômico, disponibilidade, fácil manuseio e aplicação. A ureia vem sendo incluída na alimentação dos ruminantes, a fim de substituir o nitrogênio da proteína verdadeira, que por sua vez reduz o custo da ração. Outro benefício é a melhora do aproveitamento e consumo de alimentos volumosos de baixa qualidade.

A ureia é obtida industrialmente em processo com temperatura e pressão controladas, onde a condensação do gás carbônico (CO<sub>2</sub>) com a amônia (NH<sub>3</sub>) forma inicialmente o carbonato de amônia, que, por sua vez, libera uma molécula de água, dando origem à ureia. (PEREIRA et al., 2008). A seguir é demonstrado a reação química de obtenção da ureia:



De acordo com SALMAN et al. (1996), o uso da ureia pelos ruminantes é limitado em virtude de sua baixa palatabilidade, sua segregação quando misturada com farelos e sua toxicidade em doses mais elevadas. Ainda

tem sido sugerido limitar a quantidade de ureia em até 1,0 % na matéria seca total da dieta para evitar a intoxicação do animal pelo excesso de amônia (HADDAD, 1984).

### **1.3.1 - Ciclo da ureia e produção-proteína bacteriana**

A ureia encontrada na digestão dos ruminantes apresenta duas origens: endógena, oriunda da reciclagem via saliva ou parede ruminal, através do ciclo da ornitina (ureia) que ocorre no fígado: ou de origem exógena, fazendo parte do alimento, mesmo que em pequena quantidade, bem como, pela adição de ureia sintética à ração. Essa ureia sofre a ação da enzima urease, gerando como produtos amônia, água e CO<sub>2</sub>. A amônia em conjunto com energia fornecida pelos carboidratos é utilizada pelos microrganismos do rúmen para a produção de proteína microbiana.

A proteína microbiana, sintetizada no rúmen, juntamente com a proveniente da dieta que escapa da hidrólise ruminal, são digeridas no abomaso (estômago verdadeiro) e intestino, pela ação de enzimas proteolíticas, originando aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Estes serão absorvidos no intestino, passando à corrente sanguínea, indo compor o "*pool* de aminoácidos" destinado principalmente, à síntese proteica do ruminante. A porção que não for digerida é absorvida e eliminada nas fezes do animal (VILELA & SILVESTRE, 1984). Quando em excesso, o NH<sub>3</sub> é absorvido pela parede do rúmen e, no fígado, é convertida novamente à ureia (VAN SOEST, 1994). Essa ureia pode ser excretada uma parte por via renal, uma fração volta ao rumem através da saliva ou por difusão na parede ruminal, completando seu ciclo (GONZÁLEZ et al, 2000). A Figura 1.1 ilustra o ciclo pelo qual os

derivados das fontes de NNP podem são capazes de produzir proteína microbiana, sua degradação e a formação dos excessos de amônia no rúmen.

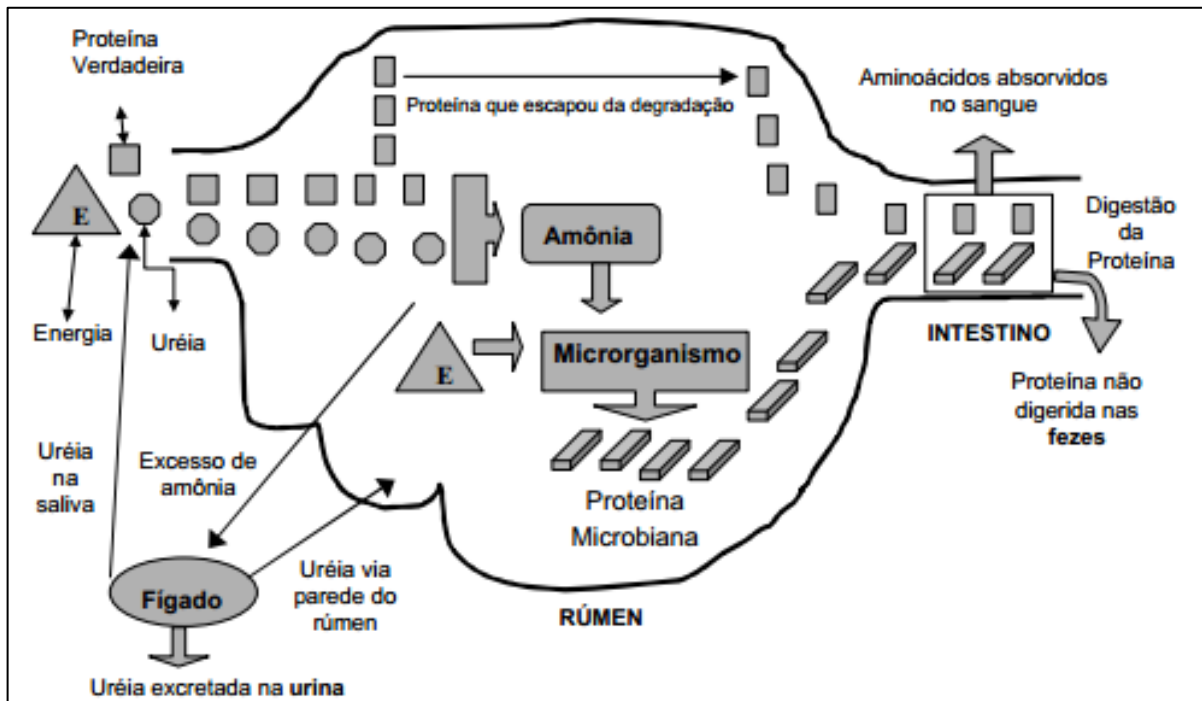


FIGURA 1.1 – Ciclo do nitrogênio não proteico e produção de proteína microbiana no rúmen. Fonte: Adaptado de TEIXEIRA, 1992.

### 1.3.2 - Intoxicação por $\text{NH}_3$

Apesar de ser utilizada como suplemento alimentar, a ureia pode ser tóxica. O consumo excessivo de ureia e de baixo teor de carboidratos fermentáveis pode resultar em casos de intoxicação pela  $\text{NH}_3$ . Esta intoxicação ocorre quando o acúmulo de  $\text{NH}_3$  no rúmen é capaz de elevar o pH neste compartimento, favorecendo a sua absorção acima da capacidade de processamento hepático (PEREIRA et al., 2008). A manutenção das concentrações corporais de nitrogênio em níveis não tóxicos exige gasto de energia extra pelo animal (PAIXÃO et al., 2006).

Nos animais a toxicidade de ureia apresenta os seguintes sintomas: inquietação, tremores, salivação excessiva, respiração rápida, falta de coordenação, inchaço e tétano, podendo levar a morte. A manutenção das concentrações corporais de nitrogênio em níveis não tóxicos exige gasto de energia extra pelo animal (PAIXÃO et al., 2006).

Os altos níveis de ureia também têm impacto ambiental, porque é um indicativo que mais nitrogênio está sendo excretado no esterco e na urina, contribuindo para o aumento de problemas na qualidade da água e do cheiro exalado pelos dejetos (ALVES et al., 2012).

### **1.3.3 - Liberação lenta de NNP**

Com a finalidade de contornar os malefícios que o excesso de ureia pode causar no organismo dos ruminantes, já existem alguns materiais produzidos comercialmente e outros em estudo, que visam controlar a liberação de ureia quando ingerida junto a alimentação. A Optigen® é uma fonte de nitrogênio não proteico de liberação lenta produzida pela Alltech. Esse produto consiste em ureia revestida por um composto biodegradável que controla a liberação do nitrogênio de uma forma gradual, em até 16 horas.

Outro material de liberação lenta foi desenvolvido em Colorcon no México consistindo em núcleos de ureia (Fermex®) com uma fracção de tamanho entre 2,38 e 2 mm, revestidos com um polímero de etilcelulose (Surelease®).

A fim de estudar o efeito desses produtos alguns estudos vêm sendo desenvolvidos. GONSALVES (2011) avaliou a digestibilidade e concentração de ureia para cordeiros alimentados com ureia pura e ureia de liberação lenta (ULL) Optigem®, associadas a duas fontes de carboidratos, contudo não indicaram alteração entre as duas fontes. LIZARAZO et al., (2012) avaliaram o efeito da digestibilidade e síntese microbiana para ovinos alimentados com feno

crescente de baixa qualidade acrescentando-se duas fontes de liberação lenta de ureia (Optigen®, Surelease). Os resultados mostraram que o uso de ureia de liberação lenta, independentemente da sua origem, não melhorou o trato digestivo total ou digestibilidade ruminal dos nutrientes ou síntese de proteína microbiana. Isso mostra que mais estudos são necessários para a melhor compreensão dos mecanismos e condições de disponibilização da ureia proveniente de compostos de liberação lenta no rumem e como isso pode afetar na digestibilidade ruminal.

Em trabalhos anteriores (PEREIRA et al., 2012 ; PEREIRA et al., 2015; YAMAMOTO et al., 2015) foram preparados e caracterizados nanocompósitos obtidos da mistura, por extrusão, de montmorilonita e ureia acrescidos ou não de materiais poliméricos (hidrogel e paraformaldeído). Esses materiais apresentaram-se capazes de reter a ureia e fornecer um comportamento de liberação lenta para esse composto, quando aplicados como fertilizantes. Sendo assim, diante da problemática apresentada, propõe-se o estudo de nanocompósitos como fonte suplementar proteica para animais ruminantes, com potencial a serem estudados na alimentação animais, para o incremento os valores de digestibilidade dos alimentos, para um melhor aproveitamento nutricional, sendo avaliado principalmente, por teste de digestibilidade *in vitro*.

#### **1.4 - Argilominerais de montmorilonita**

Um das matérias primas cerâmicas mais largamente empregadas é a argila. Além de ser um material abundante na natureza e de baixo custo, as argilas ainda possuem propriedades que facilitam seu manuseio e obtenção de novos produtos. Um exemplo disso é que em contato com a água adquire plasticidade. Por plasticidade entende-se a propriedade do material úmido ficar deformado (sem romper) pela aplicação de uma tensão, sendo que a deformação permanece quando a tensão é retirada. Ao serem misturadas em proporções apropriadas, argila e água formam uma massa plástica que é muito susceptível à

conformação. É importante diferenciar argila e argilomineral, o primeiro trata-se da matéria prima natural, já o argilomineral é especificamente a fase cristalina majoritária. Outra propriedade desses materiais é a capacidade de troca de cátions (CTC). Quando argilomineirais anidros são colocados em água ou em ambientes úmidos, os cátions trocáveis se hidratam, ocorre a entrada de água (solvatação) e o espaçamento basal aumenta, nessas condições os cátions interlamelares são susceptíveis de serem trocados por outros cátions por uma reação estequiométrica (SANTOS, 1975).

Argilas são aluminossilicatos, sendo compostas de alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) e sílica ( $\text{SiO}_2$ ), que contém água quimicamente combinada. Estruturalmente são constituídos por lâminas ou folhas tetraedrais ajustadas a lâminas ou folhas octaedrais, formando camadas que se empilham sucessivamente. As lâminas tetraedrais são formadas por tetraedros (grupos de coordenação  $\text{ZO}_4$ , onde  $Z = \text{Si}, \text{Al}$ ), ligados entre si pelo compartilhamento de oxigênios basais Figura 1.2a. As lamina do tipo octaedrais são formadas de octaedros individuais (grupos com coordenação  $\text{YO}_6$ , onde  $Y = \text{Al}, \text{Fe}, \text{Mg}, \text{O}=\text{O}, \text{OH}$ ) que se unem lateralmente pelo compartilhamento de arestas octaedrais Figura 1.2b.

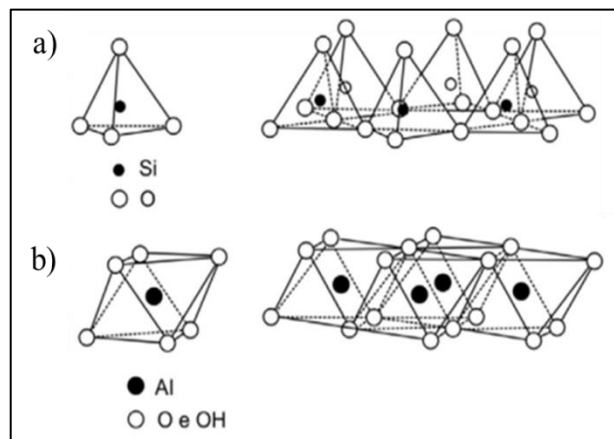


FIGURA 1.2 – (a) Tetraedros  $\text{ZO}_4$  (onde  $Z = \text{Si}, \text{Al}$ ) unidos pelo compartilhamento de átomos de oxigênio basais, formando a lâmina tetraedral; (b) Octaedros de  $\text{YO}_6$  (onde  $Y = \text{Al}, \text{O}, \text{OH}$ ) unidos pelo compartilhamento de arestas, formando lâminas octaedrais. Fonte: SILVA, 2010.



Estruturas cristalinas para os minerais de argila são relativamente complicadas; entretanto, uma característica predominante é uma estrutura em camadas. A montmorilonita é uma argilomineral do tipo 2:1, sendo constituída por duas folhas de silicatos tetraédricos, com uma folha central octaédrica, unidas entre si por oxigênios comuns às folhas. As camadas sucessivas estão ligadas frouxamente entre si e camadas de água ou de moléculas polares, de espessuras variáveis, podem entrar entre elas, chegando a separá-las totalmente deixando-as livres, quando as distâncias interplanares ficam superiores 40Å. A Figura 1.3 ilustra a estrutura das argilas do tipo 2:1.

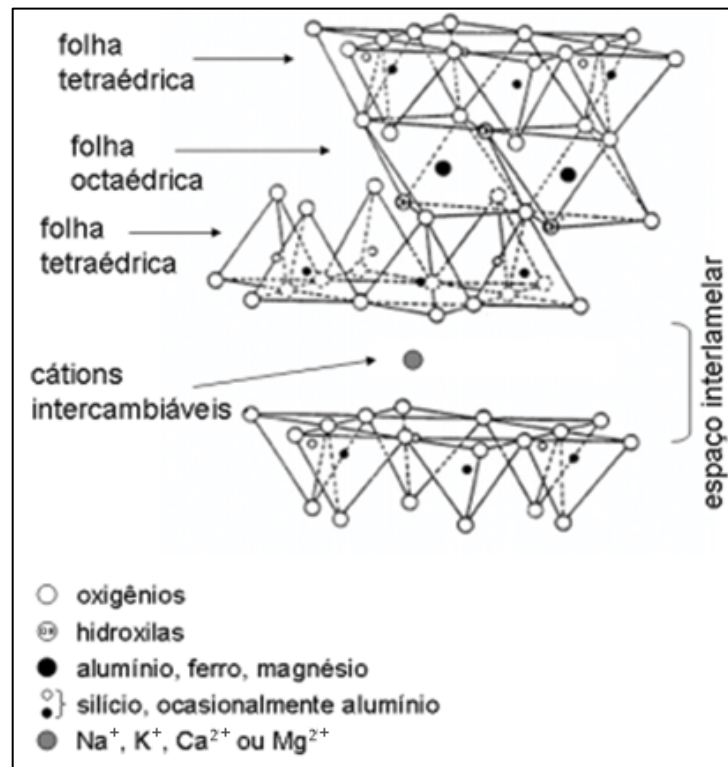


FIGURA 1.3 – Esboço da estrutura 2:1 da, montmorilonita. Fonte ALEXANDRE E DUBOIS, 2000.

## 2 - OBJETIVOS

### **Objetivo Geral:**

Avaliar diferentes nanocompósitos de liberação lenta de ureia quanto ao potencial uso na nutrição animal. O objetivo geral deste trabalho foi produzir materiais nanocompósitos de MMT/Ur, acrescidos ou não de materiais poliméricos, com comportamento de liberação lenta de nitrogênio não proteico (ureia), e testar a influência destes materiais na digestibilidade da cana de açúcar e avaliar os níveis de amônia ruminal e pH durante o processo fermentativo.

### **Objetivos Específicos:**

Obter materiais nanocompósitos pelo processo de extrusão, misturando-se diferentes relações mássicas de montmorilonita e ureia (MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2 e MMT/Ur 1:4), selecionar a relação mássica 1:4 e modificá-la com a adição de 2 materiais poliméricos (Hidrogel de poliácridamida e Paraformaldeído) de forma a obter mais 2 materiais MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf respectivamente, obtendo no total 5 nanocompósitos distintos.

Caracterizar os materiais obtidos pelo processo de extrusão para verificar composição morfológica, teores dos elementos, dentre outras características dos materiais obtidos.

Avaliar o comportamento dos materiais em meio aquoso, verificando a taxa de liberação da ureia, através do teste de liberação em água.

Estudar o efeito dos nanocompósitos sobre a digestibilidade da cana de açúcar, através do teste de digestibilidade *in vitro*. Acompanhar durante este teste os valores de produção de amônia e pH no processo fermentativo.

## **3 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 - Materiais**

A ureia (Ur) comercial utilizada foi previamente moída em moinho de bolas (Servitech CT-241) e em seguida peneirada em peneira de malha 30. A montmorilonita (MMT, Drescon S/A-Produtos de Perfuração) foi utilizada sem purificação. O hidrogel de poliacrilamida (HG) foi sintetizado de acordo com a metodologia apresentada por BORTOLIN et al. (2012), e o paraformaldeído (Pf - sólido) utilizado como recebido (Sigma-Aldrich).

### **3.2 Preparação dos compósitos**

Preparou-se 5 formulações de nanocompósitos distintas que foram divididas em 2 grupos. O primeiro grupo contendo somente misturas de montmorilonita e ureia em diferentes relações mássicas, denominados como MMT/Ur 1:1 (50% em massa de ureia), MMT/Ur 1:2 (66% ureia) e MMT/Ur 1:4 (80% ureia).

O segundo grupo foi preparado somente com a relação mássica 1:4 de montmorilonita e ureia, respectivamente, porém modificada com 2 diferentes componentes, hidrogel de poliacrilamida e paraformaldeído. Para o nanocompósito preparado com hidrogel foi adicionado 2% em massa desse material, e então denominado MMT/Ur 1:4/HG. Já para o nanocompósito preparado com paraformaldeído, foram pesadas massas de ureia e paraformaldeído de forma que uma relação molar de 1:0,5, respectivamente, fosse mantida, e então denominado MMT/Ur 1:4/Pf. Segue a tabela com a nomenclatura e a composição dos nanocompósitos obtidos:

TABELA 3.1- Composição química em percentagem dos nanocompósitos obtidos pelo processo de extrusão.

Nome	MMT	Ur	HG	Pf
MMT/Ur 1:1	50	50	-	-
MMT/Ur 1:2	34	66	-	-
MMT/Ur 1:4	20	80	-	-
MMT/Ur 1:4/HG	19,6	78,4	1,96	-
MMT/Ur 1:4/Pf	17	66	-	17

Os nanocompósitos foram preparados segundo metodologia (PEREIRA et al., 2015; PEREIRA et al., 2012; YAMAMOTO et al., 2015). Os materiais foram pesados separadamente (ureia, montmorilonita, paraformaldeído e hidrogel) de acordo com a formulação desejada e em seguida misturados até completa homogeneização. Então foi adicionada água (13% de em relação à massa total), sendo novamente homogeneizados e deixados em descanso por um período de 24h, Após este período foram extrudados em extrusora dupla rosca (Coperion Werner and Pfeleiderer) a 40 °C e 150 rpm. As formulações foram secas em temperatura ambiente por uma período de 5 dias com exceção do material MMT/Ur 1:4/Pf , que após o processo de extrusão foi colocado em estufa a 90 °C para o processo de cura (formação do polímero ureia-formaldeído).

O método escolhido para a obtenção dos nanocompósitos foi à extrusão cujo desenho esquemático é apresentado na Figura 3.1. Esse método permite a obtenção de grande quantidade de material esfoliado e/ou intercalado e de forma cilíndrica, o que facilita sua aplicação como produto final.

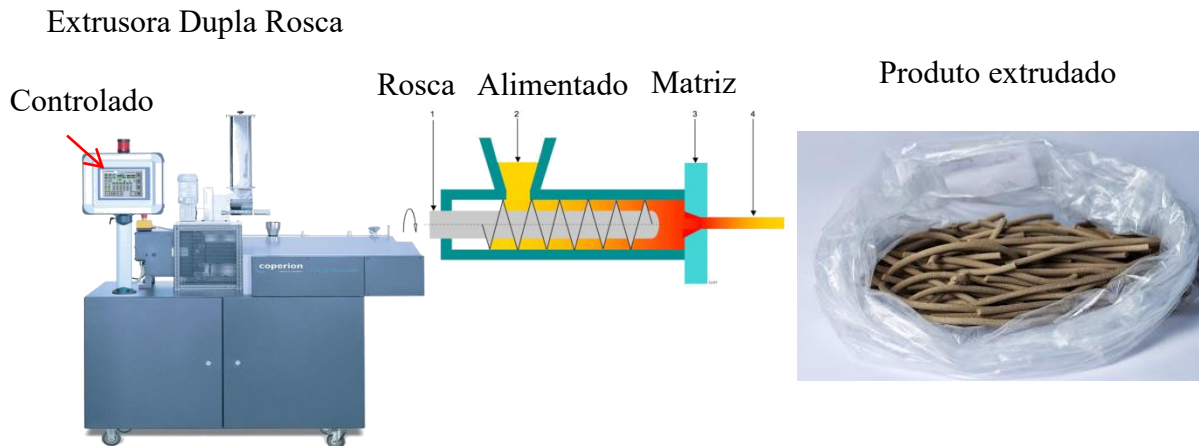


FIGURA 3.1 – Desenho esquemático do processo de extrusão, com a obtenção dos materiais nanocompósitos.

### 3.3 Caracterizações

#### 3.3.1 Difractometria de raios X (DRX)

Para a obtenção dos difratogramas de raios X utilizou-se o equipamento (difratometro SHIMADZU XDR 6000) para análise da esfoliação e/ou intercalação da montmorilonita presente nos nanocompósitos, os materiais foram macerados em cadinho, inseridos e compactados em placas de alumínio, e então analisados. A intensidade relativa foi registrada em uma faixa de dispersão ( $2\theta$ ) de 3 a  $40^\circ$ , utilizando radiação Cu-K $\alpha$  ( $\lambda = 0,1546$  nm). A velocidade de escaneamento foi de  $1^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ , a voltagem e correntes dos tubos de raios X foram de 30 kV e 30 mA, respectivamente. A técnica de difração de raios X é comumente utilizada na determinação das fases cristalinas. Sólidos cristalinos apresentam átomos que se ordenam em planos cristalinos separados entre si por distâncias da mesma ordem de grandeza dos comprimentos de onda dos raios X. Ao incidir um feixe de raios X em um cristal, o mesmo interage com os átomos

presentes, originando o fenômeno de difração. Dessa forma a distância interplanar “d” da MMT e nanocompósitos foi calculada segundo a Lei de Bragg (Equação 3.1), a qual estabelece a relação entre o ângulo de difração e a distância entre os planos que a originaram (característicos para cada fase cristalina).

$$2d\text{sen}\theta = n\lambda \quad (3.1)$$

Onde: n (=1) ordem de reflexão;  $\lambda$ : comprimento de onda dos raios X incidentes; d: distância interplanar e  $\theta$ : ângulo o de difração.

### **3.3.2 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Espectroscopia de raios X por dispersão em energia**

As características morfológicas e a análise qualitativa da composição dos materiais foram obtidas por MEV (JEOL MICROSCOPE-MODEL JSM 6510) com sistema acoplado para análise de energia dispersiva de raios X (THERMO SCIENTIFIC NSS). Os pellets de cada compósito foram quebrados manualmente e colocados em stubs com auxílio de fita carbono de forma que a região da fratura fosse analisada. As amostras foram recobertas em equipamento Sputter Coater (SCD050/LEICA) acoplado a um acessório de evaporação de carbono com fio, onde é passada uma corrente no fio até o rompimento do mesmo. A fonte de tensão na análise foi de 15KV.

### **3.3.3 - Análise Termogravimétrica**

Os compósitos e seus materiais de partida foram submetidos à análise termogravimétrica em equipamento TA Instruments TGA Q-500. Aproximadamente 10 mg das amostras foram colocadas em panela de alumínio

e aquecidas até 600 °C, a uma taxa de 10 ° min<sup>-1</sup> com fluxo de 60 ml min<sup>-1</sup> ar e 40 ml min<sup>-1</sup> N<sub>2</sub>.

### **3.3.4 - Análise elementar (CHN)**

A análise elementar dos compósitos e materiais precursores foi realizada em equipamento Analisador Elementar (CHN 2400- PERKIN ELMER). Para cada análise utilizou-se aproximadamente 5 mg de amostra.

### **3.4 - Avaliação da liberação de ureia em água**

O estudo de liberação da ureia presente nos compósitos em meio aquoso consistiu em inserir diretamente os pellets de cada material em um béquer contendo um volume de 400 mL de água destilada em pH neutro, a 25 °C e 30 rpm de agitação em equipamento Incubadora Refrigerada com Agitação (TE-421 TECNAL). Alíquotas de 0,5 mL foram coletadas em diferentes intervalos de tempo, sendo o tempo máximo de coleta de 120 h. As alíquotas foram imediatamente analisadas segundo metodologia adaptada da proposta por WITH & PETERSEN (1961) em espectrofotômetro de UV-visível (FEMTO-700 Plus) para determinação da concentração de ureia em solução. O método baseia-se na preparação do reagente de Ehrlich e uma solução 10% (v/v) de ácido tricloroacético. Para análise misturam-se 0,5 mL da amostra, 0,5 mL do reagente de Ehrlich e 2 mL da solução de ácido tricloroacético e efetua-se a leitura no espectrofotômetro UV-visível ( $\lambda = 435$  nm), obtendo-se os valores de absorbância relativos a concentração de ureia nos respectivos tempos de coleta.

A massa de cada compósito foi obtida de forma a constituir a mesma quantidade de ureia em todos os experimentos, além de terem sido

realizados em quintuplicata. Também realizou-se o teste com ureia comercial pura para fins de comparação. A Figura 3.2 ilustra como foi realizado o teste de liberação a coleta das alíquotas e análise no UV-Vis.

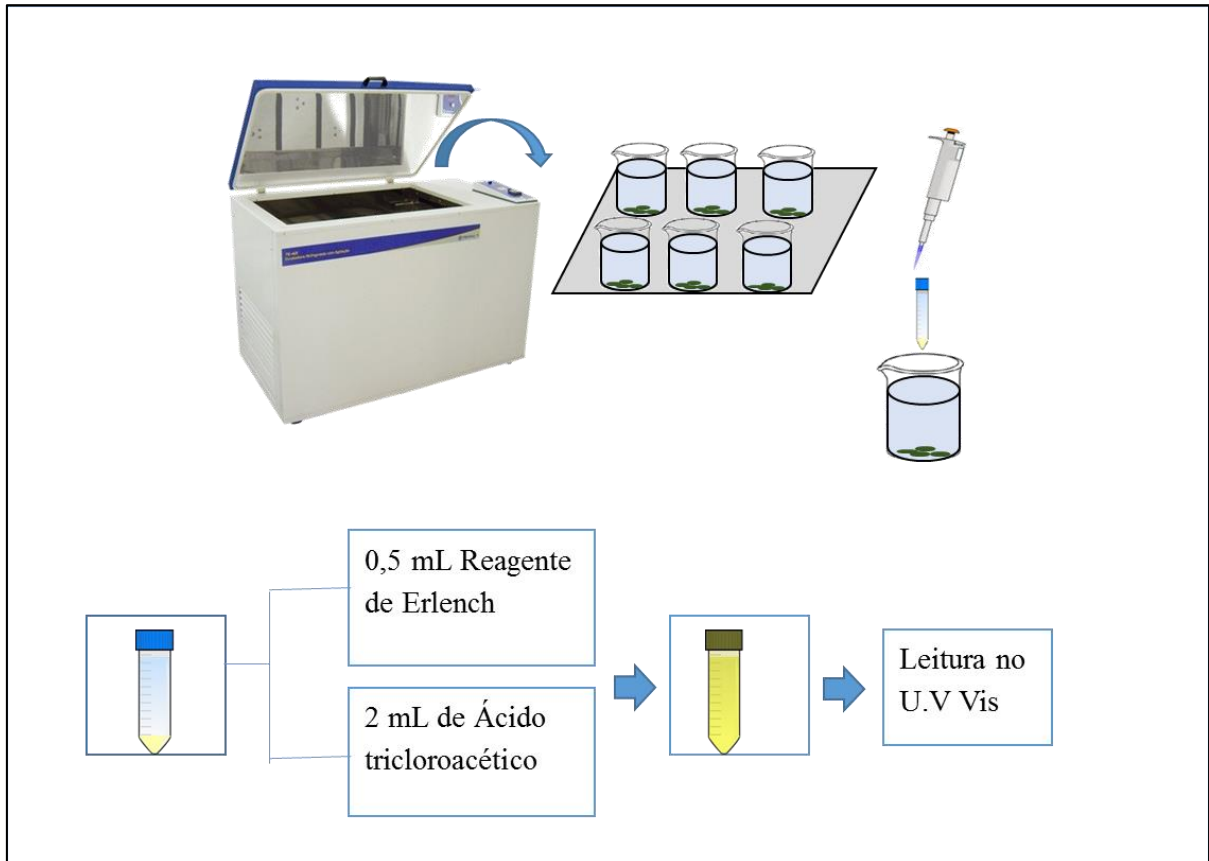


FIGURA 3.2 – Esquema ilustrativo do teste de liberação em meio aquoso realizado em Incubadora refrigerada.

A determinação da concentração de ureia em cada tempo de coleta no teste de liberação foi determinada através da utilização de uma curva analítica de ureia (Figura 3.3).



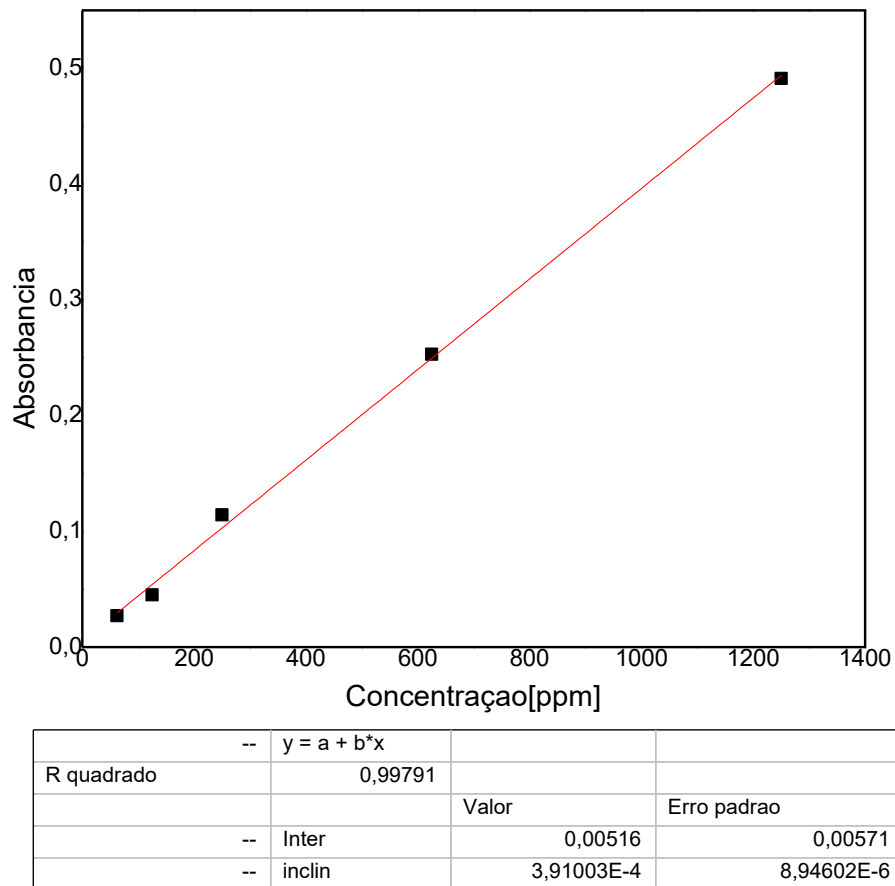


FIGURA 3.3 - Curva analítica de ureia utilizada no teste de liberação.

### 3.5 - Teste de Digestibilidade *in Vitro* da Matéria Seca

O experimento foi conduzido na Embrapa Pecuária Sudeste (São Carlos-SP). Avaliou-se a digestibilidade *in vitro* da matéria seca da cana de açúcar pura e quando suplementada com 7 materiais distintos: MMT/Ur 1:1; MMT/Ur 1:2 ; MMT/Ur 1:4; MMT/Ur 1:4/HG; MMT/Ur 1:4/Pf; MMT pura: ureia pura. No estudo utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 x 8 (procedimentos x classes de alimentos).

Os compósitos foram secos em estufa com circulação de ar a 90 °C, triturados em cadinho de porcelana e peneirados em peneira de 25 mesh, de onde foram obtidos grânulos menores que 1 mm (Figura 3.4).

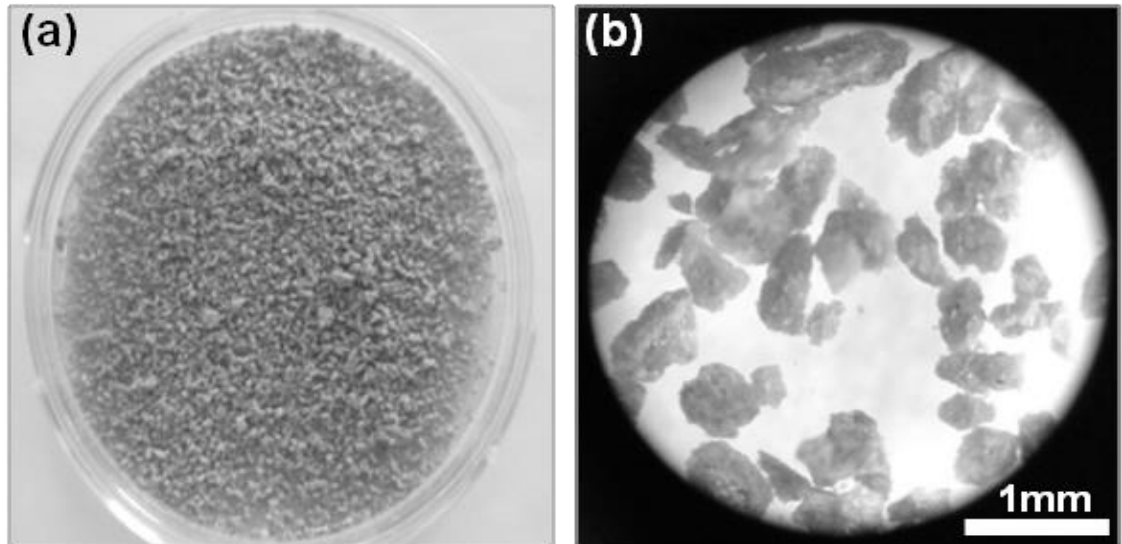


FIGURA 3.4 – Imagem dos nanocompósitos moídos: (a) tamanho real e (b) imagem no microscópio.

A cana utilizada foi fornecida pela Embrapa Pecuária Sudeste. Esse material foi seco a uma temperatura de 60 °C durante o período de 72 h, então moído em moinho de facas, e peneirado em peneira de 25 mesh, de forma a obter um material com granulometria menor que 1 mm. Este material foi analisado quanto sua composição química e os resultados são apresentados na Tabela 3.2.

TABELA 3.2: Percentagem massa/massa (% m/m) da cana de açúcar utilizada no teste de digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

	<b>MS</b>	<b>PB</b>	<b>FDA</b>	<b>FDN</b>	<b>FB</b>	<b>Cinzas</b>	<b>EE</b>	<b>Lignina</b>	<b>DIVMS</b>	<b>NNP</b>
<b>M</b>	95.35	2.44	35.38	58.14	28.50	2.11	1.12	4.88	52.71	0.11
<b>S</b>	0.86	0.46	1.54	2.85	2.50	0.19	0.39	1.40	2.30	0.02
<b>%(m/m)</b>	0.90	18.75	4.36	4.90	8.76	9.09	34.60	28.67	4.36	19.47

**MS:** material seca

**PB:** proteína bruta

**FDA:** fibra em detergente ácido

**FDN:** fibra em detergente neutro

**M:** Média

**%(m/m)** percentagem massa massa

**FB:** fibra bruta

**EE:** extrato etéreo

**DIVMS:** digestibilidade “in vitro” da matéria seca

**NNP:** nitrogênio não proteico

**S:** Desvio Padrão

O líquido ruminal foi coletado 1 h antes do início do experimento e armazenado em garrafa térmica pré-aquecida. Para isso utilizaram-se 2 animais fistulados no rumem que ficaram de jejum por 12 h. A coleta foi feita em diversas partes do rumem, de forma a garantir uma homogeneidade no líquido. Após a coleta o líquido foi imediatamente filtrado e armazenado até o preparo do experimento de digestibilidade (Figura 3.5).



FIGURA 3.5 – Coleta e filtragem do líquido ruminal utilizado no teste de digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

A solução tampão atua controlando o pH, mantendo as condições ideais para o desenvolvimento dos microrganismos e também permitindo o meio adequado para a máxima atividade da enzima uréase presente no meio ruminal. Essa solução foi preparada de acordo com a composição indicada na Tabela 3.2

TABELA 3.3: Composição da solução tampão preparada para o teste de digestibilidade *in vitro*.

Composição	(gL <sup>-1</sup> )
Bicarbonato de Sódio	9,80
Fosfato de Sódio Bibásico	9,30
Cloreto de Sódio	0,47
Cloreto de Potássio	0,57
Cloreto de Cálcio anidrido	0,04
Cloreto de Magnésio anidrido	0,06

O experimento foi conduzido em dois estágios. Primeiro determinou-se a digestibilidade aparente em sistema automatizado incubadora *in vitro* (TECNAL TE-150). Nesta etapa as amostras foram pesadas e seladas a quente em sacos F-57 (ANKOM Technology Corp., Fairport, NY) de forma a obter 0,5 g cana de açúcar e 1% (m/m) de ureia para todos os materiais em cada saco (Figura 3.5).



FIGURA 3.6- Filtros F57 (saquinhos) contendo amostra selada, utilizados no teste de digestibilidade.

Cada jarro de digestão continha uma classe de alimento totalizando 24 saquinhos, sendo 18 de amostra e 6 vazios (branco). As amostras foram incubadas em uma relação 4:1 (v/v) de uma solução tampão (saliva artificial ou solução de Macdougall com pH final 6,69) e 400 mL do líquido ruminal. Os saquinhos foram distribuídos de forma uniforme com o auxílio de um marcador divisório dentro do jarro e purgou-se CO<sub>2</sub> durante 5 minutos para se ajustar o pH. Os jarros foram incubados a 39 °C e agitação rotacional branda. O experimento foi conduzido por um período total de 96 h. As amostras foram estudadas em triplicata e em 6 tempos distintos: 12h, 24, 36, 48, 72 e 96 h. Durante o teste também se acompanhou o pH do meio com o auxílio de um pHmetro para os mesmos tempos de coleta. A cada coleta, os saquinhos foram lavados com água quente até que se tornasse límpida e levados em estufa por 24 h. Os saquinhos secos foram pesados e armazenados em dessecador para a segunda etapa. A figura 3.6 ilustra o procedimento da primeira etapa da DIVMS.

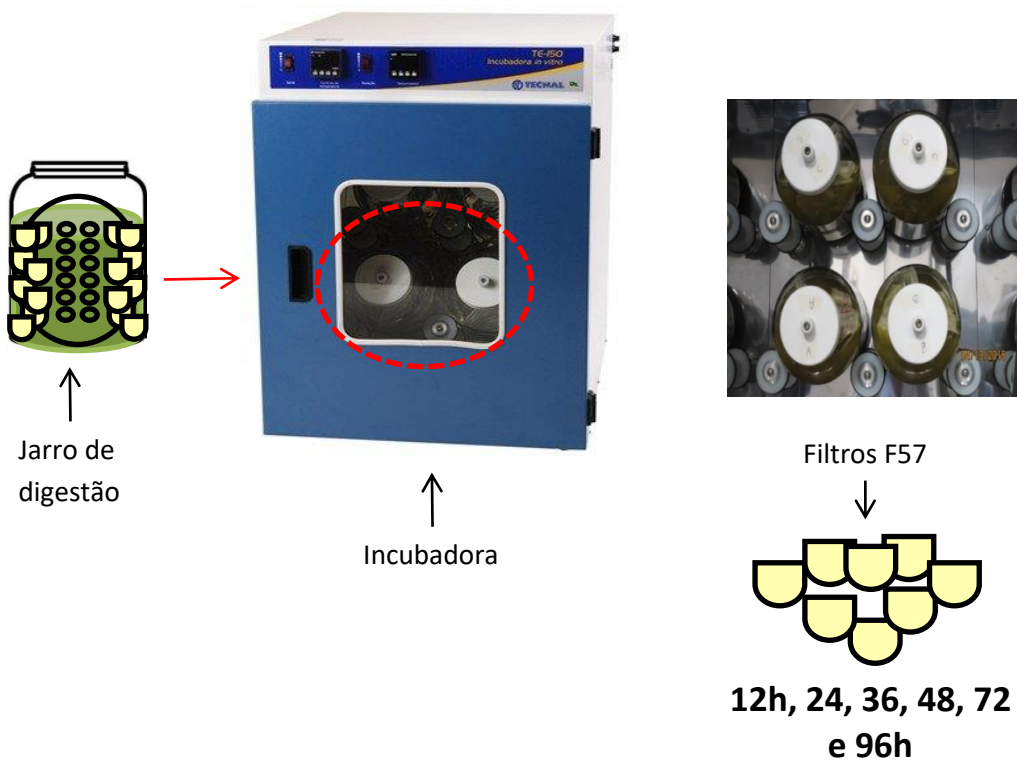


FIGURA 3.7- Ilustração do teste de digestibilidade *In Vitro* da Matéria Seca.

Na segunda etapa, os saquinhos coletados em diferentes intervalos de tempo na etapa de incubação foram submetidos ao refluxo em solução de detergente neutro para a obtenção do resíduo não digerido da parede celular livre de material microbiano, o que viabiliza a determinação da digestibilidade verdadeira (VAN SOEST et al., 1991; VAN SOEST, 1994). A análise de fibra em detergente neutro (FDN) foi realizada em equipamento analisador de fibra (Ankon-200). Após o período 1:15 h em solução de detergente neutro, foram feitas 3 lavagens de 15 minutos em água deionizada. Após este procedimento os saquinhos foram secos em estufa a 90 °C e pesados, visando aos cálculos de digestibilidade in vitro da matéria seca (DIVMS) (ANKOM, 2005).

#### **Calculo da DIVMS:**

$$100 - (W3 - (W1 \times C1)) \times 100 / (W2 \times DM) \quad (\text{Equação 3.2})$$

#### **Onde:**

**W1**= Peso do Filtro

**W2**= Peso da amostra

**W3**= Peso final após o tratamento in vitro e FDN

**DM**= Matéria Seca

**C1**= Fator de correção

A determinação da evolução do nitrogênio amoniacal durante a incubação foi realizada pelo método espectrofotométrico por análise em injeção de fluxo (FIA) em espectrofotômetro (FEMTO-432) acoplado a bomba peristáltica (ISMATEC-IPC). Com pipetador automático foram coletados 5 mL de líquido ruminal de cada jarro e armazenados em tubo falcon contendo 0,2 mL de uma solução aquosa de ácido sulfúrico (50% v/v). O método consiste na injeção da amostra em um fluxo transportador impulsionado por uma bomba peristáltica. A amostra durante seu transporte recebe os reagentes: Hidróxido de

sódio (NaOH 1,5Mol/L denominado Reagente 1 (R1)) ; Hidróxido de sódio( 0,75mol/L, empregado como fluxo receptor (Rec)); Solução de ácido salicílico + nitroprussiato de sódio, preparada em meio NaOH 0,35mol/L, : 5% (m/v) de citrato de sódio (evita precipitações de hidróxidos de metais , 0,50% m/v) de nitroprussiato de sódio ( como agente que catalisa a velocidade de formação no cromóforo originam o Reagente 2 (R2)); Solução comercial de Hipoclorito de sódio como Reagente 3 (R3). Ao término formam o complexo azul de indofenol cuja coloração é proporcional à concentração de amônia presente na amostra (SOUZA et al., 2002). O equipamento e os reagentes utilizados na análise são mostrados na Figura 3.7.

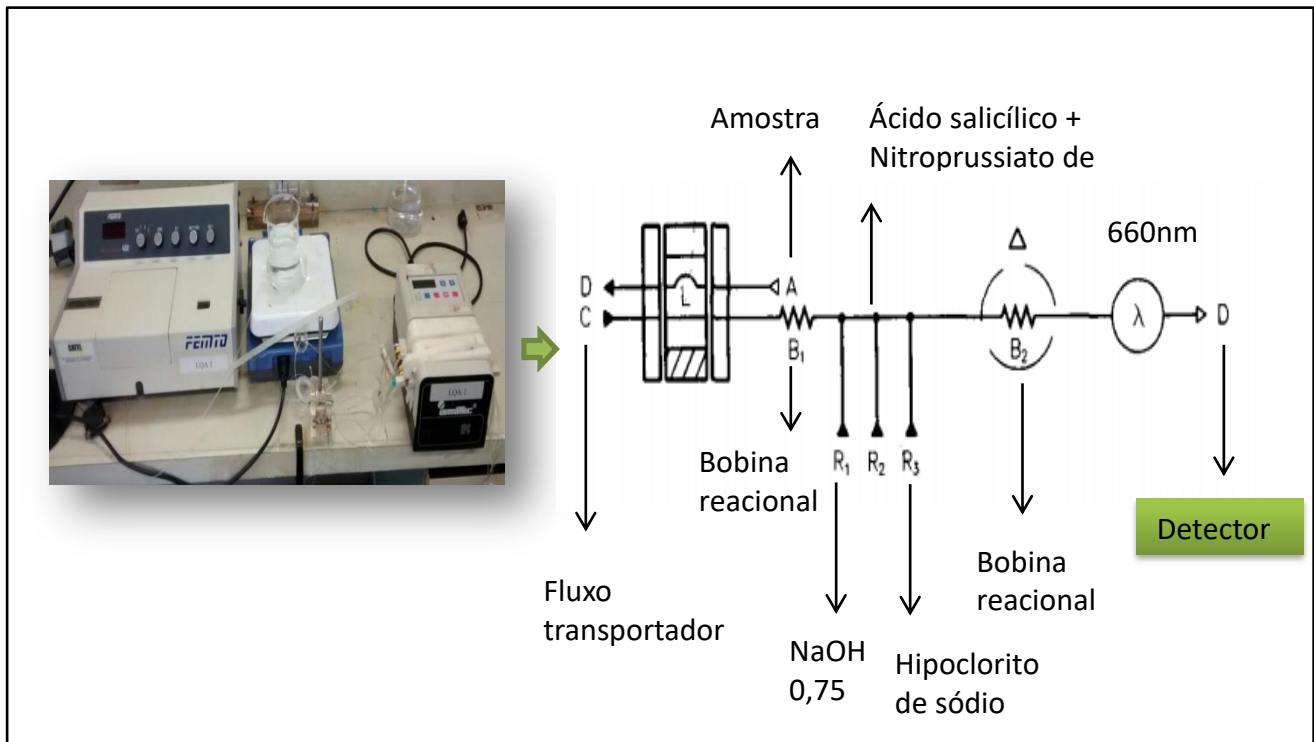


FIGURA 3.8- Equipamento e reagentes utilizados na determinação da concentração de amônia durante o teste de digestibilidade por análise por ingestão em fluxo



Para avaliar a confiabilidade dos resultados de digestibilidade verdadeira foram realizadas análises estatísticas de variância e teste de comparações múltiplas de Duncan. A taxa inicial e a velocidade de digestão foram determinadas pelo ajuste de regressões logarítmicas. O software utilizado nas análises foi o R 3.1.3 e o nível de significância adotado foi de 5%.

### **3.6 - Inibição da urease**

Esse teste foi realizado a fim de verificar se a presença da MMT pode inibir a atividade da urease. O teste foi realizado segundo metodologia proposta por OLIVEIRA et al. (2012). Utilizou-se a urease tipo III extraída da *Canavalia ensiformis* (Jack Bean), com atividade específica de 15000-50000 U/g sólido (1U irá liberar 1  $\mu$ mol de  $\text{NH}_3$  da ureia por minuto em pH 7 a 25 °C).

Para a realização do teste de inibição foi necessário preparar as seguintes soluções:

- Solução tampão de fosfato de sódio 0,05 mol L<sup>-1</sup> com pH 7:

Pesou-se 3,4022 g de fosfato monobásico de potássio, e 4,3545 g de fosfato dibásico de potássio. Dissolveu-se separadamente em meio aquoso, transferiu-se para um balão volumétrico de 1000 mL, completou-se o volume com água destilada e homogeneizou-se. Conferiu-se o pH com auxílio de um pHmetro e armazenou-se em geladeira (validade de 30 dias).

- Solução de Urease:

Pesou-se 0,014g de uréase e adicionou-se 1,25 mL do tampão de fosfato de sódio.

- Solução de Ureia:

Para o preparo da solução de ureia, pesou-se 1 g de ureia, dissolveu-se no tampão, transferiu-se para um balão de 1000 mL e completou-se o volume com a solução tampão de fosfato de sódio.

Para o ensaio de inibição da urease cada material foi estudado em triplicata, sendo classificados como, controle, 20% (material contendo 1,25 mg MMT) e 50% (material contendo 5mg MMT). Essas quantidades de MMT adicionadas equivalem às mesmas utilizadas no teste de digestibilidade, correspondendo aos materiais MMT/Ur 1:4 (20 % MMT) e MMT/Ur 1:1 (50 % MMT), respectivamente. Previamente foi pesada uma massa de 1,25mg MMT e 5mg de MMT equivalentes a (20% e 50% citadas anteriormente). Aos frascos adicionou-se 980 µL de solução tampão de fosfato e 20 µL da solução de uréase aguardou-se 5 minutos , sendo então adicionado 0,5 mL da solução de ureia, os frascos foram tampados e conduzidos á agitação branda em mesa agitadora (MARCONI) por um período de 25 minutos.

A quantificação da  $\text{NH}_3$  foi feita imediatamente, pelo método espectrofotométrico de análise por injeção de fluxo FIA. Para auxiliar na quantificação dos resultados foi preparada uma curva padrão de fosfato de amônio de 5 a 200 ppm. Para isso pesou-se 100 mg de fosfato de amônio, dissolveu-se em água destilada, em seguida transferiu-se para um balão de 500 mL e completou-se o volume com água. As demais concentrações da curva foram obtidas através a diluição adequada da solução de 200 ppm.

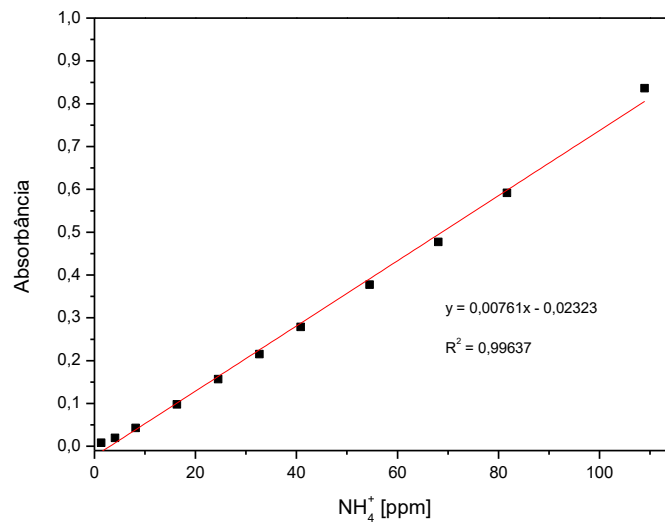


FIGURA 3.9- Curva Analítica, concentração de amônio versus absorvância, leitura por método espectrofotométrico.

#### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente os nanocompósitos e a MMT pura foram caracterizados por difratometria de raios X (DRX) para verificar se houve esfoliação e/ou intercalação do argilomineral nos nanocompósitos. Para isso foi monitorado o espaçamento basal do plano  $d_{001}$  da MMT como mostrado na Figura 4.1a. A distância interlamelar foi calculada de acordo com a Lei de Bragg ( $2 \cdot d \cdot \sin\theta = n \cdot \lambda$  -  $d$  é distância interplanar,  $\theta$  ângulo de difração,  $n$  ordem de reflexão e  $\lambda$  comprimento de onda). Com base nessa equação e na Figura 4.1b, que representa uma aproximação da região de interesse, a MMT apresentou  $2\theta = 6,84$  (com  $d = 1,30$  nm) e os materiais nanocompósitos  $2\theta = 5$  com  $d = 1,77$  nm. De acordo com a equação, uma diminuição no ângulo de reflexão é acompanhado por um aumento no espaçamento interplanar. Observou-se uma grande diminuição na intensidade do pico do plano cristalográfico 001 da MMT para todos os materiais, indicando que a MMT presente nos materiais

nanocompósitos sofreu o processo de intercalação através introdução da ureia nos espaços intercamadas (AHMADI et al., 2004 ; NING et.al, 2010).

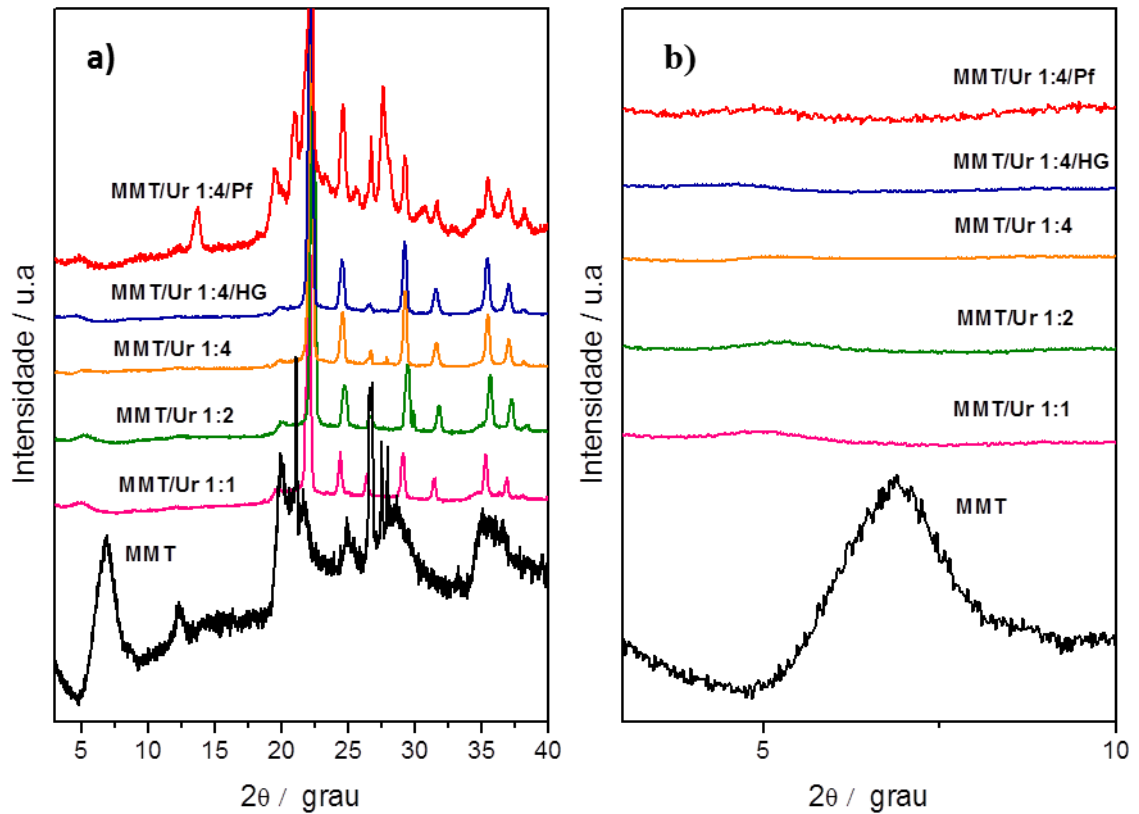


FIGURA 4.1- Difratomia de Raios-X para MMT pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2, MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf. (a) DRX com varredura de 3 a 40 °C, (b) aproximação da região  $d_{001}$  de 5 a 10 °C.

A fim de verificar a morfologia dos materiais foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Os resultados são mostrados na Figura 4.2. A estrutura lamelar característica da MMT foi observada em todos os nanocompósitos, porém pouco pronunciada nos materiais MMT/Ur 1:4, evidenciando uma maior dispersão da MMT com o aumento na proporção de ureia. Houve uma diminuição do tamanho de partículas identificadas como

crystalos de ureia para os materiais MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf , em relação à ureia pura. O compósito MMT/Ur 1:4/Pf apresentou crystalos na forma de agulhas identificados como ureia polimerizada (ureia-formaldeido). Essa modificação no tamanho e forma dos crystalos está relacionada a recristalização da ureia solubilizada durante o processo de obtenção dos compósitos.

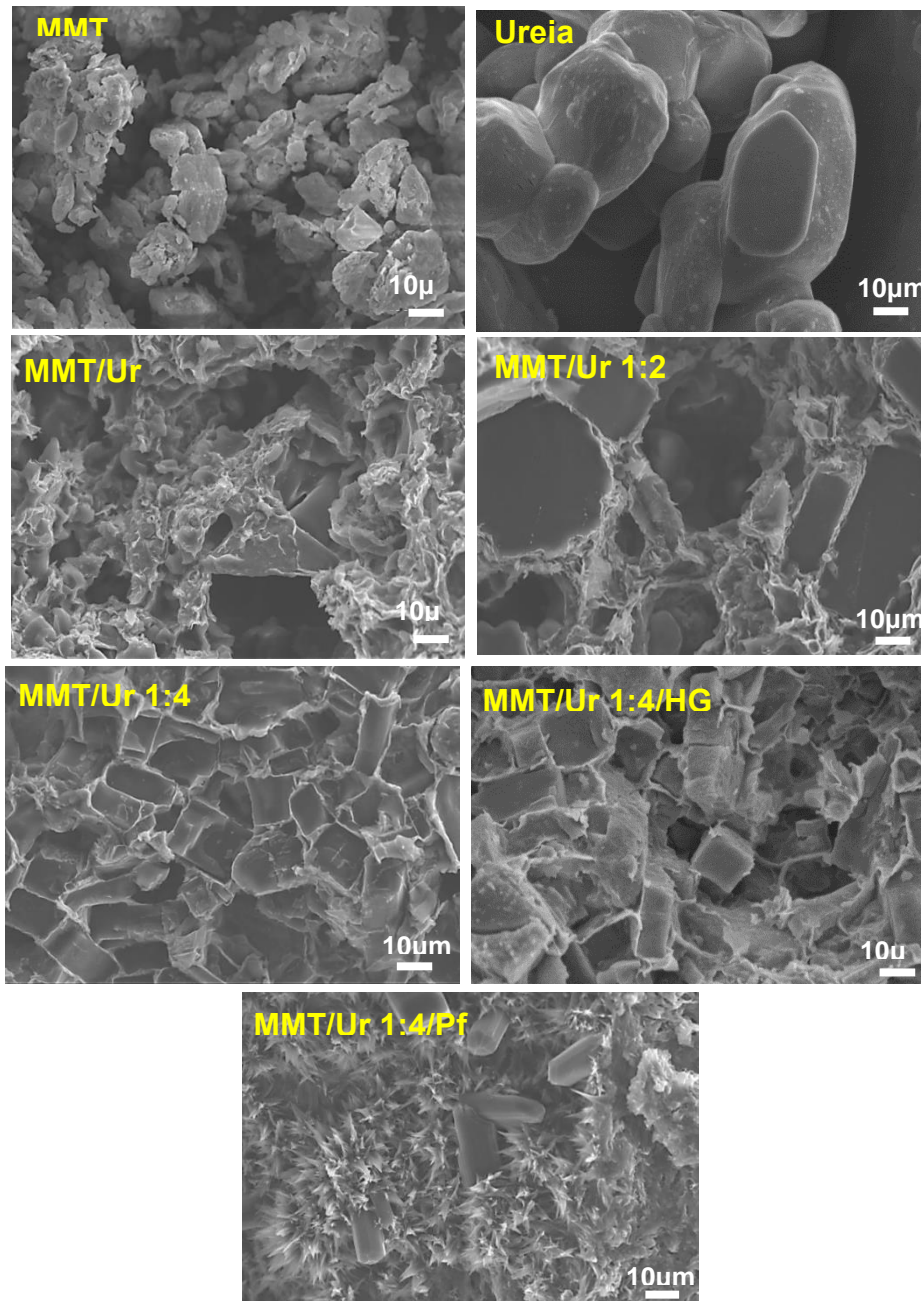
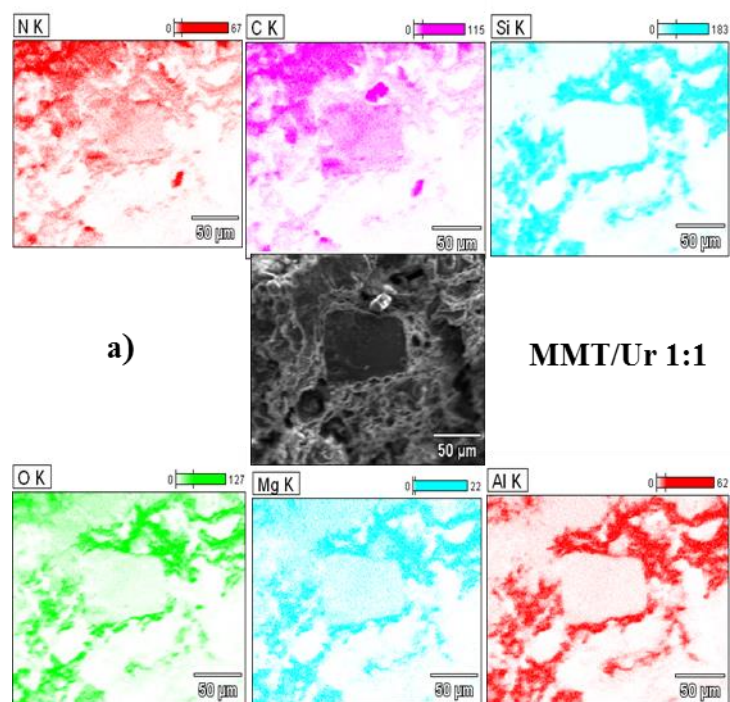
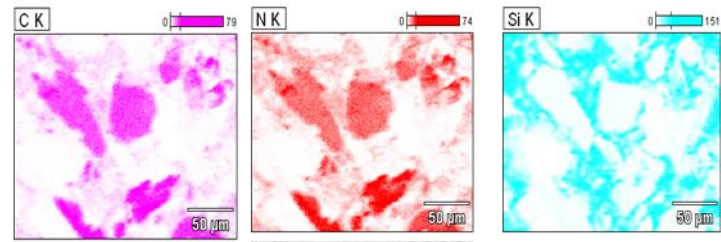


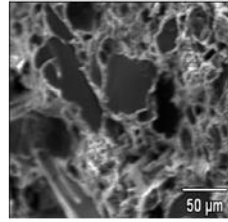
FIGURA 4.2 Micrografias obtidas por MEV da ureia pura moída, montmorilonita pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2, MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf.

Para confirmação das regiões identificadas como ureia, ureia polimerizada e MMT foi realizada a análise por MEV-EDX, cujos resultados estão apresentados na Figura 4.3a-e. Por meio desta análise confirmou-se que os cristais na forma de agulha e os na forma de grânulo possuíam como elementos majoritários o N, O e C, e as formas lamelares ou material entorno das partículas o Al, Mg e Si, característicos da ureia e MMT, respectivamente.

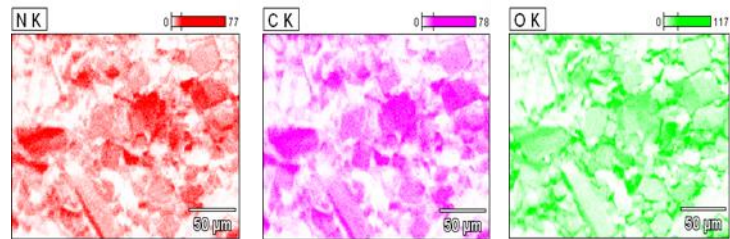
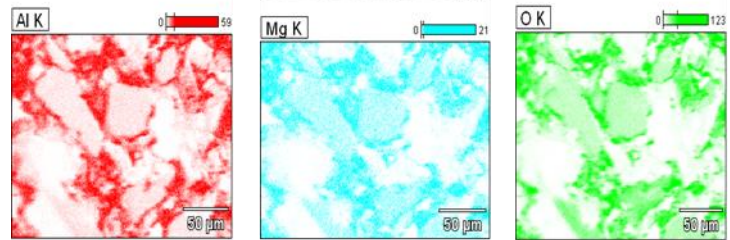




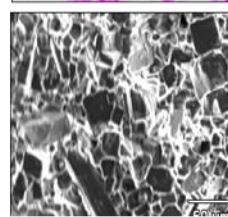
b)



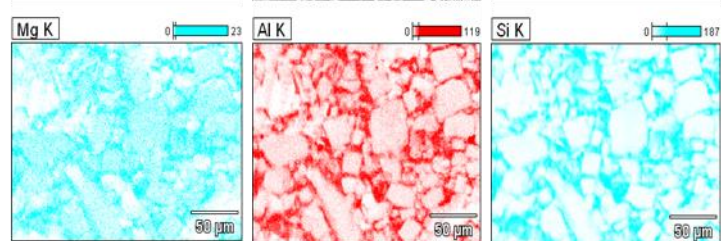
MMT-Ur-1-2



c)



MMT/Ur 1:4



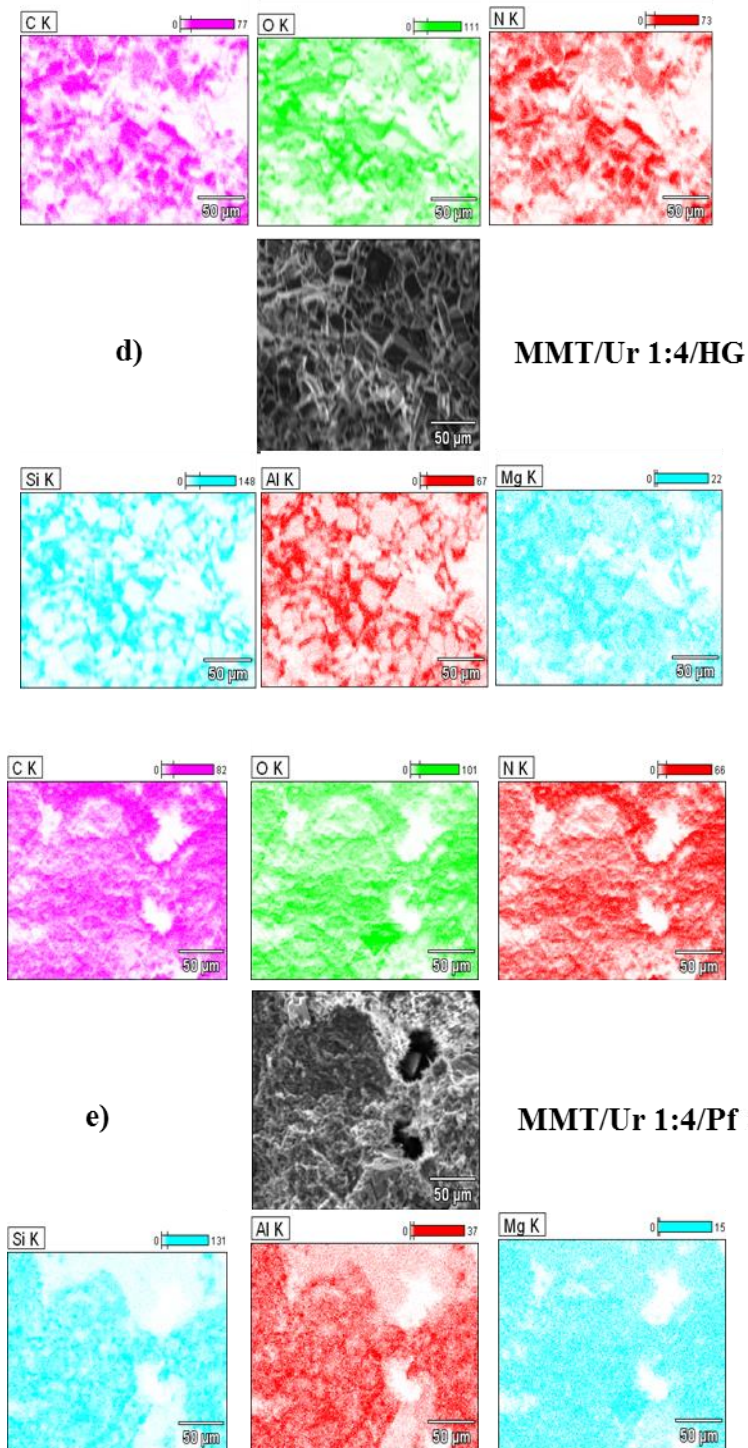


FIGURA 4.3 - Imagens de EDX para os materiais nanocompósitos, identificação dos elementos C, N, O, Mg, Al, Si nas regiões, (a) MMT/Ur 1:1, (b) MMT/Ur 1:2, (c) MMT/Ur 1:4, (d) MMT/Ur 1:4/HG, (e) MMT/Ur 1:4/Pf.



A decomposição térmica dos materiais foi estudada por análise termogravimétrica e sua primeira derivada (TG e dTG). Os resultados da TG podem ser observados na Figura 4.4. A MMT pura praticamente não apresenta perda de massa na faixa de temperatura estudada. Já a ureia pura se decompõe completamente até 400 °C.

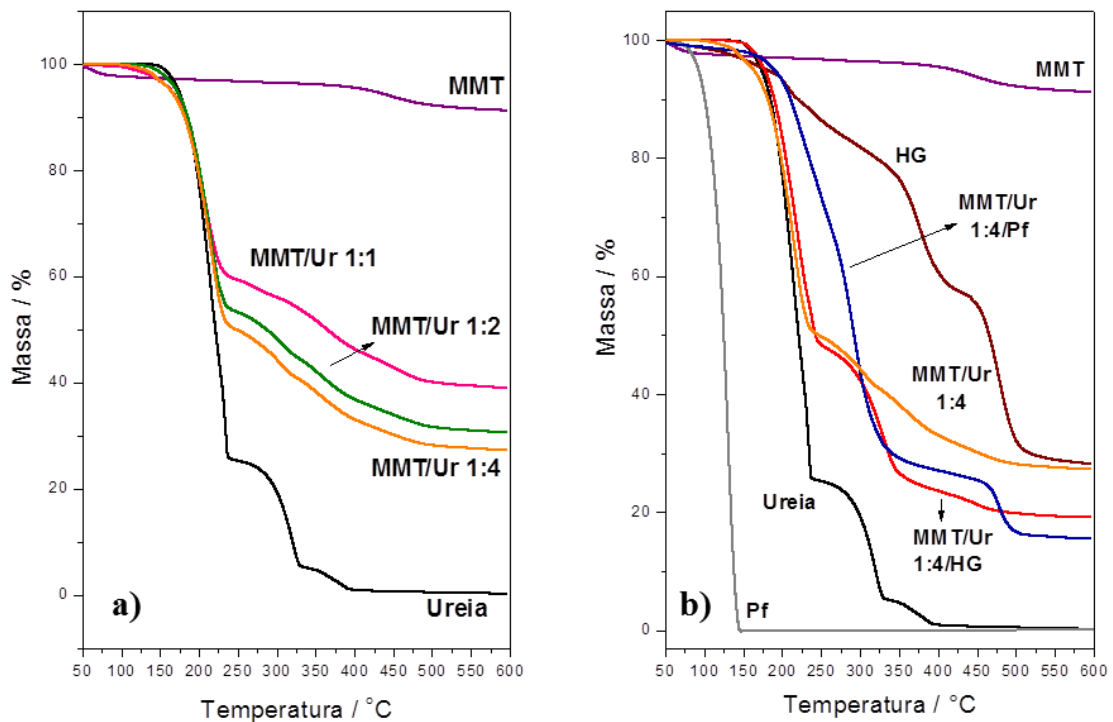


FIGURA 4.4- Curva Termogravimétrica (a) da MMT pura, ureia pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2 e MMT/Ur 1:4; (b) da MMT pura, ureia pura, HG puro, Pf puro e nanocompósitos da MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf. Todos os nanocompósitos apresentam resíduos finais correspondentes a massa de MMT adicionada a cada formulação, estes resultados podem ser melhor observados na Tabela 4.1.

TABELA 4.1: Resíduo final em massa (%) após a análise termogravimétrica (TG).

Composto	Resíduo Final (%)
MMT	91
Ureia	0
MMT/Ur 1:1	39
MMT/Ur 1:2	31
MMT/Ur 1:4	27
MMT/Ur 1:4/HG	19
MMT/Ur 1:4/Pf.	15

Para melhor visualização das etapas de perdas de massa analisou-se também a DTG tantos dos materiais precursores, quanto dos nanocompósitos, mostradas na Figura 4.5a-b.

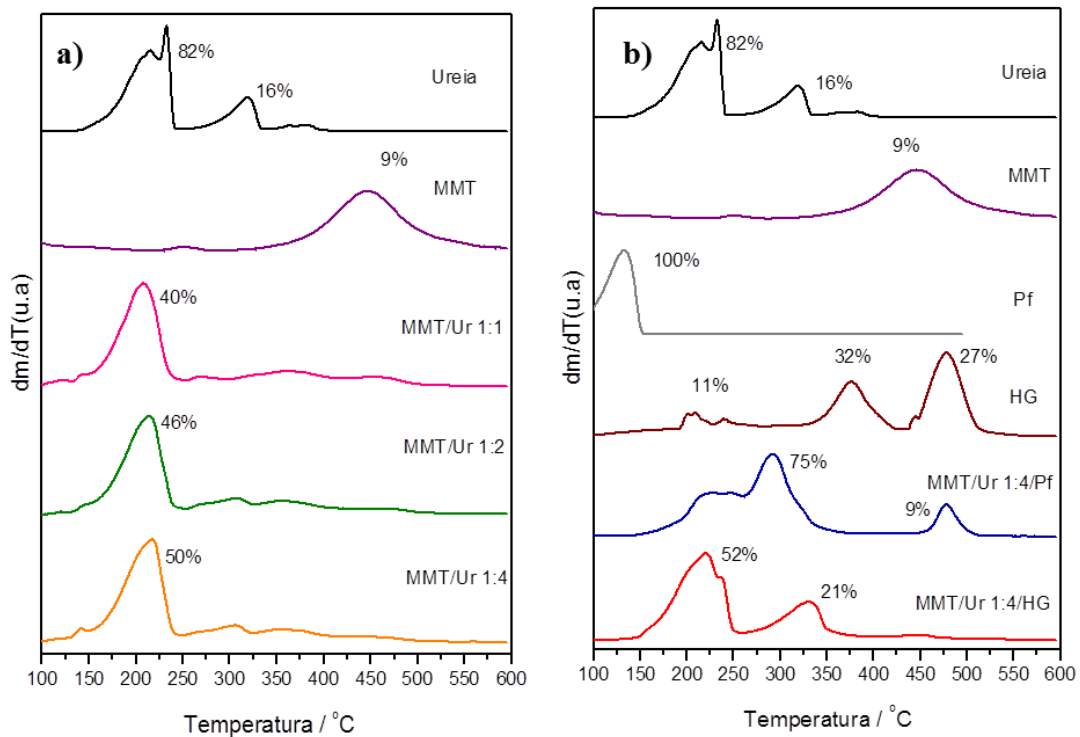


FIGURA 4.5- Derivada da Curva Termogravimétrica (a) da MMT pura, ureia pura e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2 e MMT/Ur 1:4 (b) da MMT pura, ureia pura, HG puro, Pf puro e nanocompósitos da MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf.

A figura 4.5 (a) Apresenta os resultados da MMT e ureia puros e dos nanocompósitos contendo apenas MMT/Ur. A ureia pura apresentou os mesmos estágios de perda de massa observados por BRACK et al. (2014) e CHEN & ISA (1998), iniciando-se antes do ponto de fusão (132,5 °C) até aproximadamente 400 °C com a completa oxidação do material. A MMT pura apenas apresenta perda de massa temperaturas da ordem de 800 °C, a perda de 9% observada corresponde à perda de água estrutural ou desidroxilação da bentonita, o mesmo observado por ZHANG et al. (2015). Os nanocompósitos de MMT/Ur apresentaram os mesmos picos de perda de massa da ureia pura, porém o primeiro pico apresentou deslocamento para menores temperaturas devido à coesão entre os materiais. A figura 4.5 (b) apresentou os mesmos resultados da figura 4.5 (a) para ureia e MMT puros. O HG puro apresentou 3 etapas de perda de massa: 100 e 230 °C (eliminação de água), de 300 à 430 °C (oxidação dos grupos amida laterais do polímero e do agente de reticulação), e por fim 430 à 560 °C (degradação das cadeias de poli(acrilamida)). O Pf puro despolimeriza em temperaturas acima de 115 °C, a formaldeído, sendo rapidamente volatilizado acima desta faixa (YAMAMOTO et al., 2015). (a) Nos materiais com polímero, o MMT/Ur 1:4/Pf diferenciou-se dos demais apresentando um deslocamento para maiores temperaturas de degradação no primeiro e segundo pico. Este comportamento indica a polimerização da ureia neste composto. Observou-se ainda que não houve perda significativa de massa na faixa de 115 °C, indicando que todo o paraformaldeído foi convertido primariamente, estando portanto polimerizado na estrutura com ureia. O MMT/Ur 1:4/HG teve deslocamento para maiores temperaturas, indicando que houve interação entre ureia e hidrogel. O pico a 350 °C é um indicativo desta interação, podendo ser atribuído à frações ureia mais fortemente ligadas ao hidrogel.

Para analisar a composição química das formulações, os materiais foram estudados por análise elementar (CHN) como mostrado na Tabela 4.1. A MMT não possui N em sua composição química, logo o teor de N esperado para os compósitos será proporcional à quantidade de ureia presente em cada formulação. De acordo com o esperado todas as formulações apresentaram os níveis corretos de N, evidenciando que não houve perdas de nitrogênio por volatilização durante o processo de extrusão. A ureia também possui C em sua composição, um aumento na percentagem deste elemento foi observado sendo proporcional à quantidade de ureia adicionada a cada formulação. Os valores acima do esperado para esse elemento podem ser atribuídos à presença de matéria orgânica no argilomineiral. O percentual de H correspondeu a cada parcela distinta de ureia nas formulações. Alguns valores um pouco acima do esperado são atribuídos à presença de moléculas de água de hidratação.

Tabela 4.2: Análise elementar, percentagens dos elementos C, N e H para ureia pura, MMT, HG e nanocompósitos MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2, MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf

<b>Amostras</b>	<b>N (%)</b>	<b>C (%)</b>	<b>H (%)</b>
Ureia	41.11 ± 1.43	18.76 ± 0.66	5.73 ± 0.30
MMT	0.01 ± 0.01	0.33 ± 0.01	1.42 ± 0.05
Hidrogel	9.38 ± 0.44	26.16 ± 1.17	4.62 ± 0.20
MMT/Ur 1:1	23.3 ± 0.03	11.8 ± 0.83	3.68 ± 0.05
MMT/Ur 1:2	26.72 ± 0.78	12.64 ± 0.38	3.98 ± 0.01
MMT/Ur 1:4	34.8 ± 0.95	16.3 ± 0.34	4.99 ± 0.02
MMT/Ur1:4/Pf	30.31 ± 0.01	18.88 ± 0.59	4.67 ± 0.04
MMT/Ur1:4/HG	32.83 ± 0.71	15.72 ± 0.31	4.72 ± 0.18

O estudo de liberação de ureia em água a partir dos materiais estudados é mostrado na Figura 4.6. Este teste foi realizado com o intuito de avaliar a solubilização da ureia nos nanocompósitos em meio aquoso quando comparados com ureia pura. A ureia pura foi totalmente solubilizada em menos de 5 horas. O processo de liberação nos compósitos ocorre por difusão em meio aquoso, com temperatura e agitação constantes. Todos os compósitos apresentaram comportamento de liberação mais lento em relação ao material puro. O MMT/Ur 1:1 atingiu 100 % da disponibilização da ureia em 24 h e o MMT/Ur 1:2 em 48 h. Mesmo após 120 h, o MMT/Ur 1:4 não liberou toda a ureia presente, atingindo aproximadamente 84 %.

O compósito MMT/Ur 1:4/HG apresentou comportamento de liberação mais lenta comparado aos materiais produzidos somente com MMT e Ur, sendo que até 96 h de experimento liberou 80% da ureia presente. Porém, em 120 h toda a ureia foi liberada. Acredita-se que a presença de um polímero hidrofílico (HG) atue competindo com a água presente no meio, dificultando a difusão da ureia através do grânulo. Já o MMT/Ur 1:4/Pf foi o material que obteve maior retenção da ureia, sendo que em 96 h o material disponibilizou cerca de 70% de ureia presente em sua estrutura. O retardo na liberação se deve à estrutura polimérica formada, que necessita ser quebrada para solubilização.

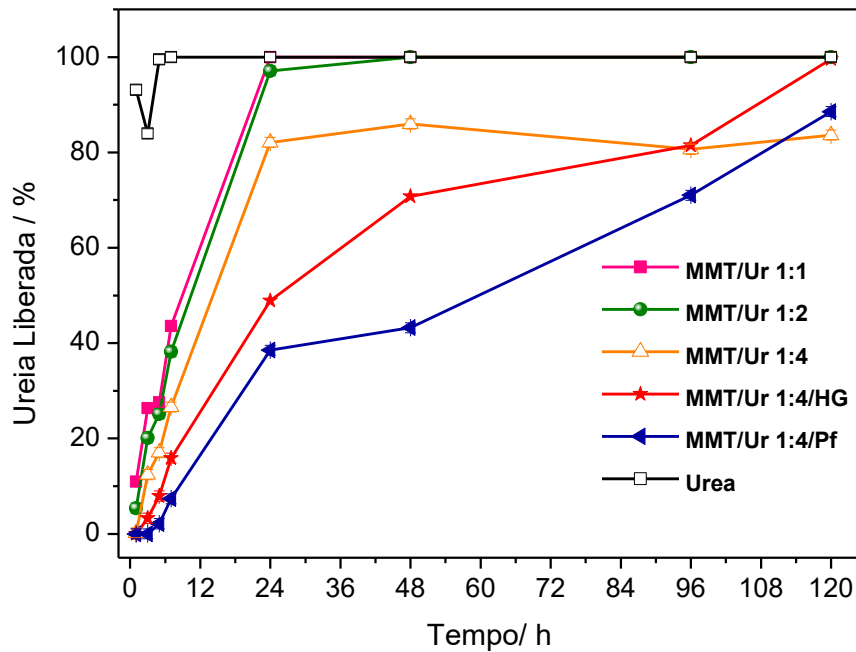


FIGURA 4.6 Percentual de ureia liberada em função do tempo para ureia pura e nanocompósitos em função do tempo, em pH neutro e Temperatura de 25 °C.

A Figura 4.7 mostra as imagens dos materiais após 120 h de experimento. O Material MMT/Ur 1:4 teve os grânulos desestruturados por completo, o mesmo foi observado para as outras formulações contendo apenas MMT/Ur e para o material MMT/Ur 1:4/Pf. Já o material MMT/Ur 1:4/HG apresentou uma resistência a dissolução dos grânulos, que esta atribuída a presença do hidrogel.



FIGURA 4.7- Imagens dos grânulos dos nanocompósitos após 120 h de experimento de liberação.

Os materiais foram submetidos ao teste de digestibilidade *in vitro* da matéria seca. Este teste simula a digestão ruminal do alimento, no caso a cana de açúcar, uma vez que o meio contém as mesmas condições de digestão do organismo, tais como: flora de microrganismos, pH adequado, temperatura do rúmem e meio tamponado. A primeira etapa deste teste fornece a digestibilidade microbiana obtida pelo processo fermentativo ao longo do tempo estudado. Os resultados podem ser observados na Figura 4.8. Os resultados mostraram que houve ganho percentual na digestibilidade quando adicionou-se os nanocompósitos à cana de açúcar, isso pode ser afirmado com base no percentual de digestão da cana de açúcar pura.

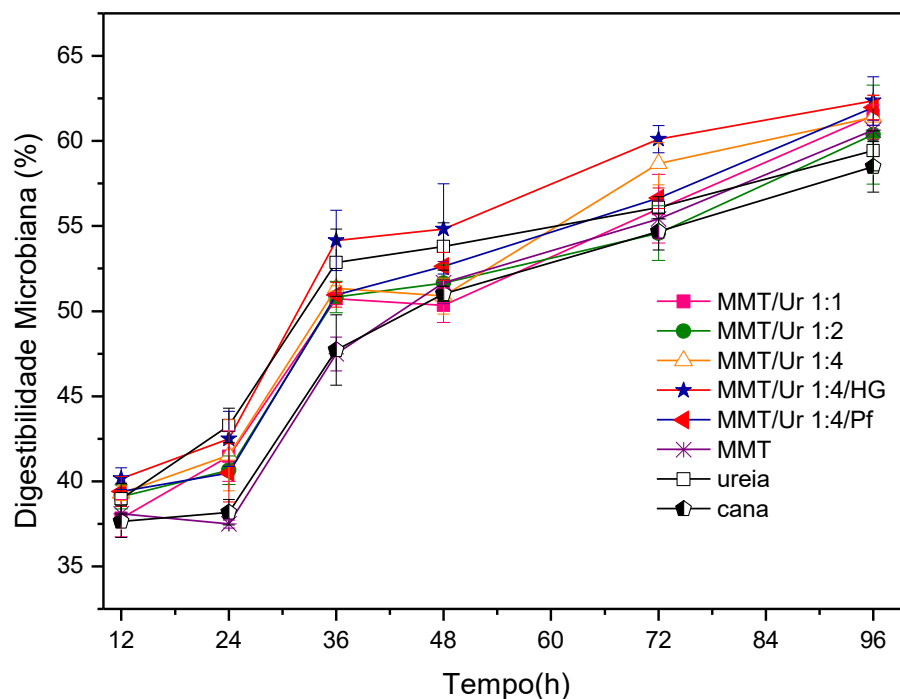


Figura 4.8- Digestibilidade microbiana, obtida do teste de digestibilidade *in vitro* da matéria seca para cana pura e cana acrescida dos materiais nanocompósitos e ureia pura.

O valor de digestibilidade microbiana não é considerado o resultado final da digestão do alimento, pois podem haver resíduos de restos de microrganismos e parede celular, presos aos filtros, que levariam a um valor incorreto. Por isso, se faz necessário a segunda etapa que promove uma lavagem em solução de detergente neutro a fim de remover esses resíduos e proporcionar a digestibilidade verdadeira, cujos resultados são mostrados na Tabela 4.2. A digestão máxima da cana em 96 h foi de 59,75%. Os materiais MMT/Ur 1:1, MMT/Ur 1:2, MMT/Ur 1:4, MMT/Ur 1:4/HG e MMT/Ur 1:4/Pf apresentaram ganhos na digestibilidade de 3,49; 2,2; 3,18; 3,61 e 2,9 %, respectivamente. A ureia não apresentou ganho no valor de digestibilidade. A MMT pura apresentou ganho de 1,98 % na digestibilidade máxima, o que pode estar correlacionado à capacidade de troca de cátions desse material, favorecendo uma estabilização nas concentrações de  $\text{NH}_4^+$ . Os resultados demonstram que os materiais compósitos de liberação lenta, são capazes de promover uma melhora na digestibilidade da matéria seca da cana de açúcar quando comparados a digestão da cana de açúcar pura.



TABELA 4.3: Resultados em percentagem da digestibilidade da cana de açúcar em função do tempo do teste de digestibilidade *in vitro* da matéria seca.

<b>Tempo(h)</b>	<b>12</b>	<b>24</b>	<b>36</b>	<b>48</b>	<b>72</b>	<b>96</b>
<b>Material</b>						
<b>Cana de açúcar</b>	40.5 ± 0.4	43.9 ±0.5	50.8 ± 1.8	54.7 ± 0.6	58.8 ± 0.5	59.8 ± 0.9
<b>MMT</b>	41.9 ± 0.1	44.3 ±0.3	50.9 ± 0.6	54.8 ± 0.8	59.1 ± 0.9	61.7 ± 0.3
<b>Ureia</b>	41.1 ± 0.3	47.9 ±1.1	54.6 ± 1.8	57.0 ± 0.8	59.3 ± 0.2	60.4 ± 0.8
<b>MMT/Ur 1:1</b>	42.4 ± 1.2	47.7 ±1.2	54.0 ± 0.1	55.6 ± 0.6	59.9 ± 0.9	63.2 ± 0.6
<b>MMT/Ur 1:2</b>	42.3 ± 0.4	46.8 ±0.2	52.9 ± 0.9	56.2 ± 0.4	59.3 ± 1.0	61.9 ± 1.2
<b>MMT/Ur 1:4</b>	42.4 ± 0.5	47.7 ±0.6	53.9 ± 0.3	53.9 ± 0.3	61.2 ± 0.7	62.9 ± 1.1
<b>MMT/Ur1:4/HG</b>	42.6 ± 0.3	50.1 ±0.9	55.8 ± 1.6	58.0 ± 1.2	61.8 ± 0.5	63.4 ± 0.9
<b>MMT/Ur 1:4/Pf</b>	42.2 ± 0.3	46.2 ±1.1	53.2 ± 0.6	55.2 ± 0.5	59.3 ± 0.2	62.6 ± 0.8

Para melhor visualização do efeito no ganho de digestibilidade, os resultados de foram expressos em função do aumento na digestibilidade quando comparados à digestão da cana pura. Os resultados são mostrados em ganho percentual de digestão para cana suplementada para os diferentes nanocompósitos após 96 h de digestão (Figura 4.9).

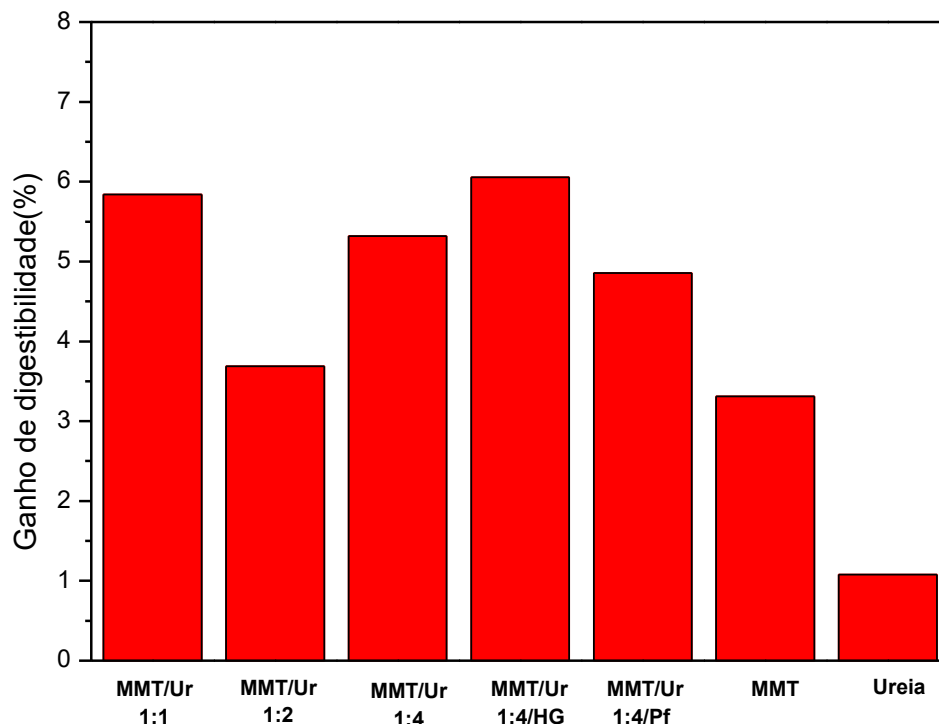


FIGURA 4.9 Ganho de digestibilidade na digestão da matéria seca da cana de açúcar para cana acrescida dos nanocompósitos, MMT e ureia pura.

Para verificar a confiabilidade dos resultados foi feito um estudo estatístico do teste de digestibilidade. Alguns dos resultados estatísticos são mostrados na Figura 4.10a-b. A constante representa o patamar de início da digestão, os resultados mostrados na que mostra que a cana apresentou valor inferior aos demais a ureia maior valor e os materiais foram similares entre si.

A Figura 4.10-b mostra que os valores de Beta encontrados não apresentaram diferença significativa para  $P > 0,05$ , indicando que a velocidade de digestão é similar entre os materiais. Já os valores e da constante apresentou

$P < 0,05$  (Figura 4.10b), logo existe pelo menos uma diferença entre os materiais.

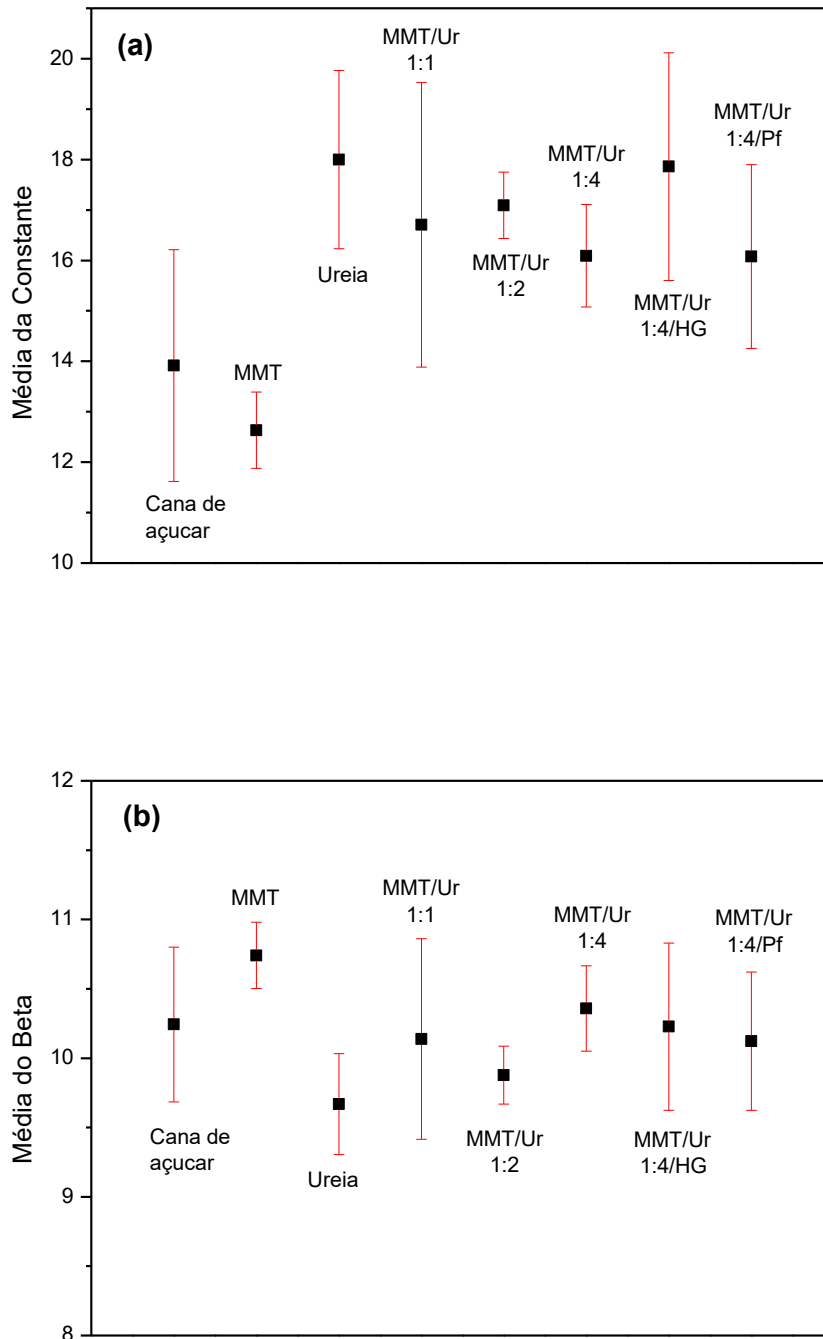


FIGURA 4.10 Análise estatística do teste de digestibilidade: (a) media da constante (b) média do Beta.

Uma vez que se verificou que de fato existiam diferenças significativas entre os pares de média no valor de digestibilidade, buscou-se compreender onde e como estas diferenças estavam contidas nos valores obtidos no teste. Para isso escolheu-se o ultimo ponto (96h) da Tabela 4.2, pois este representa a digestibilidade máxima, e aplicou-se o teste de comparações múltiplas. Os resultados são mostrados na Figura 4.11.

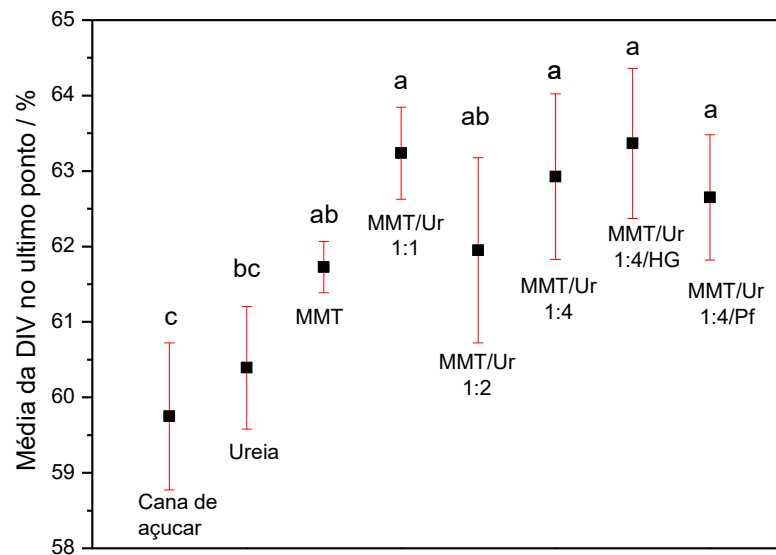


FIGURA 4.11- Análise estatística da digestibilidade do ultimo ponto para cana de açúcar pura e quando suplementada com ureia pura, MMT pura e nanocompósitos.

Os resultados mostrados na Figura 4.11 mostram que todos os nanocompósitos e a MMT pura possuem valores de digestibilidade distintos da cana de açúcar, pois pertencem a um grupo diferente do material puro (indicado pela letra c). O Material MMT/Ur 1:2 e a MMT apresentaram digestibilidades semelhantes à ureia pura, ambos pertencendo ao grupo (b). Por fim o único material que apresentou digestibilidade semelhante à cana pura foi à ureia,

evidenciando que a suplementação nesse caso, não teve efeito sobre a digestibilidade da cana de açúcar.

A figura 4.12 apresenta os resultados de concentração de amônia ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) durante o teste de digestibilidade. Todos os materiais apresentaram um aumento nas concentrações de amônia até 1h30m. Neste tempo a concentração de amônia era em média  $50 \text{ mg.L}^{-1} \text{ NH}_3$  para os materiais, com exceção da cana pura. Após esse período, observou-se uma queda até 12 h de experimento. Esta queda pode estar associada ao nível mínimo requerido de  $\text{NH}_3$  no líquido ruminal para a máxima síntese microbiana, consumindo o  $\text{NH}_3$  disponível para síntese proteica, explicando a queda na concentração (HOOVER et al., 1986). Valores diferentes também foram apontados em outros trabalhos. LENG & NOLAN (1984) sugerem uma faixa de  $\text{NH}_3$  de  $150\text{-}200 \text{ mg.L}^{-1}$  e SATTER & SLYTER (1974)  $50\text{-}80 \text{ mg.L}^{-1}$  de  $\text{NH}_3$ . Outro fator que pode ser atribuído a queda de concentração de  $\text{NH}_3$  no líquido ruminal é a capacidade de troca de cátions da MMT, podendo atuar “capturando” parte do N presente no meio. A ureia apresentou concentração máxima ( $\text{NH}_3$ ) em 48h, já os materiais MMT/Ur 1:4/Pf, MMT/Ur 1:4 e MMT/Ur 1-:2, tiveram concentrações superiores em maiores tempos. De acordo com o esperado, a cana e a MMT apresentaram níveis inferiores de  $\text{NH}_3$  quando comparadas aos nanocompósitos e a ureia pura uma vez que não houve fonte adicional de ureia. As concentrações encontradas para a cana e MMT são provenientes do líquido ruminal e da cana.

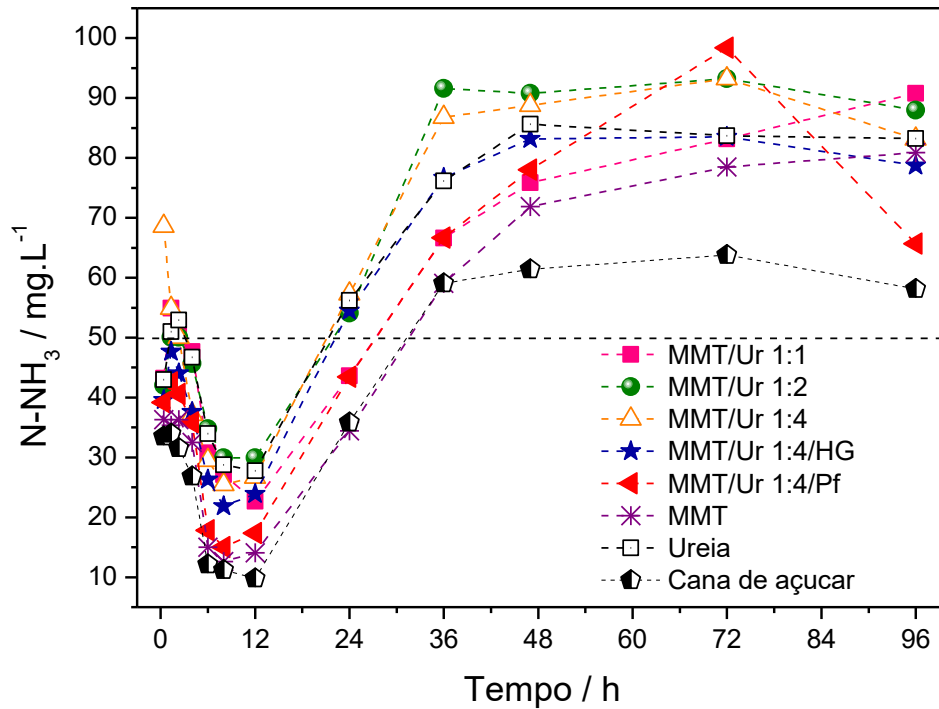


FIGURA 4.12 Concentração de amônia (mg/L) durante o teste de digestibilidade para cana pura, e cana acrescida de ureia pura, MMT pura e nanocompósitos em função do tempo.

As fontes dietéticas de nitrogênio incluem ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, peptídeos, amins, amidas, nitratos, nitritos, ureia e amônia. Fontes endógenas incluem células descartadas e ureia que voltam a entrar no rúmen através do epitélio ou na saliva. Com a exceção de algumas proteínas e nitrogênio associado à ADF (adenosina difosfato), outras fontes de nitrogênio são facilmente solúveis e susceptíveis à degradação no rúmen (HUNTINGTON & ARCHIBEQUE, 1999). A concentração de  $\text{NH}_3$  até 36 h para a cana de açúcar e a MMT é bem similar, após este tempo os valores para a MMT aumentam acredita-se que nesse ponto a argila comece a liberar o íon  $\text{NH}_4^+$  retido, já a cana pura mantém-se constante. O material MMT/Ur 1:4/Pf, como apresenta uma cinética de liberação mais lenta que os demais, podendo liberar a ureia após os máximos de síntese microbiana, gerando acúmulo de  $\text{NH}_3$

não utilizada na síntese proteica e passível de volatilização. De fato, observou-se uma queda anormal de concentração no intervalo de 72-96 h, que pode estar relacionado a este fenômeno. É importante destacar que mesmo após 96 h os níveis de  $\text{NH}_3$  no líquido ruminal foram bem inferiores ao valor considerado tóxico ( $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ ) (OWENS & BERGEN, 1983). A literatura mostra que não existe um valor único. Outros autores admitem a toxicidade quando níveis excedem  $1760 \text{ mg.L}^{-1}\text{NH}_3$  no líquido ruminal. Alguns trabalhos reportam que o nível considerado tóxico irá depender do pH e do tempo em que essa  $\text{NH}_3$  será disponibilizada no rumem. (HELMER & BARTLEY, 1971)

A evolução do pH durante o teste de digestibilidade *in vitro* foi acompanhada, uma vez que o valor de pH influencia diretamente no processo digestivo. Os resultados são mostrados na Figura 4.13. A queda inicial nos valores de pH até 12 h, pode ser atribuída ao consumo de  $\text{NH}_3$  para a formação de proteína e conseqüentemente liberação de ácido láctico. Todos os materiais tiveram máximos valores de pH cerca de 7,1, com exceção da MMT, cujo valor encontrado foi 6,96. O menor valor de pH pode estar associado a capacidade adsortiva desse material. É importante ressaltar que os valores de pH se mantiveram na faixa ótima, uma vez que a atividade da urease é maior entre a faixa de pH de 7 a 9 (PEARSON & SMITH, 1943). A atividade bacteriana é influenciada também pelo pH, como máxima atividade na faixa entre 5.5 e 7 (DAVIS & STALLCUP, 1964).

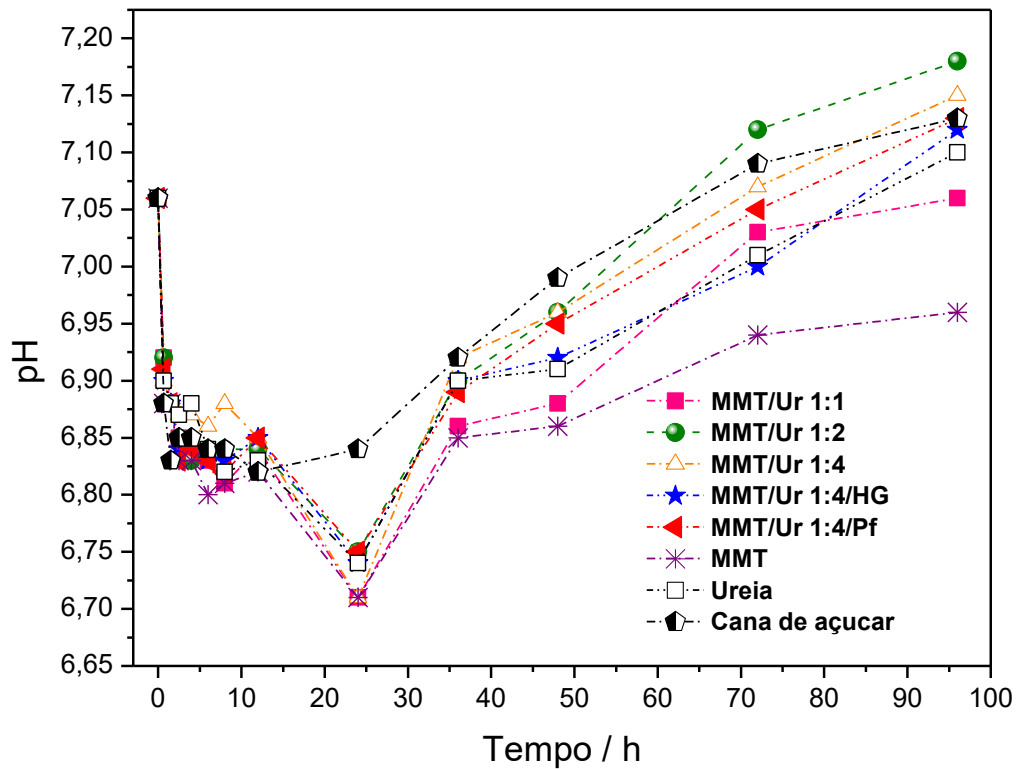


FIGURA 4.13 – Valor de pH durante o teste de digestibilidade para cana pura, e cana acrescida de ureia pura, mmt pura e nanocompósitos em função do tempo.

A Figura 4.14 mostra os resultados do teste de inibição da uréase. Os resultados mostraram que houve diferença nas concentrações de  $\text{NH}_3$ , apresentando menores concentrações quanto maior a massa de MMT presente. Acredita-se que o tempo de reação e a quantidade de enzima foram suficientes para a completa conversão de ureia em amônia uma vez que vários cálculos foram feitos obedecendo à atividade enzimática da urease para que a conversão total ocorresse. A ureia foi completamente convertida em  $\text{NH}_3$  no controle, mas não nos materiais com 20 e 50% de MMT, acredita-se que a MMT pode estar



atuando inibindo de alguma maneira a urease ou diminuindo a concentração de  $\text{NH}_4^+$  pela troca de cátions interlamelares.

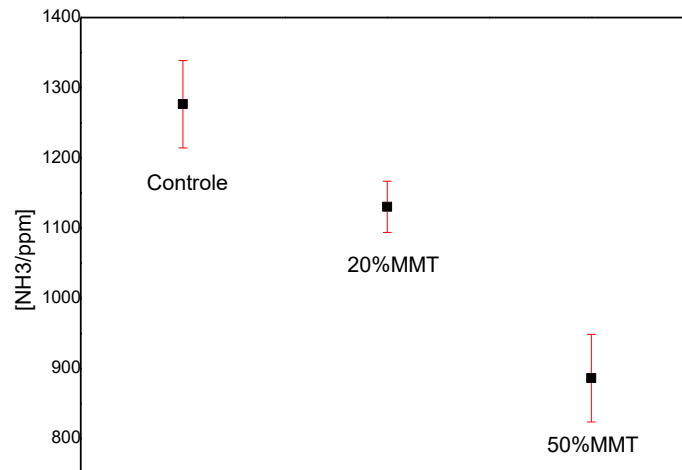


FIGURA 4.14- Concentração de  $\text{NH}_3$  (ppm) no ensaio de inibição de uréase, controle (material sem adição de MMT), 20% MMT e 50% de MMT.

## 5. CONCLUSÃO

Em resumo, obteve-se diferentes materiais nanocompósitos com capacidade de retenção e liberação lenta de ureia. Os testes de caracterização indicaram que o processo de extrusão é eficaz, fornecendo grande quantidade de material, além disso mostrou que a MMT sofre exfoliação durante este processo, através da entrada de ureia intercamadas, dificultando a solubilização dos grânulos em meio aquoso. Ainda pode-se confirmar que não houve perdas de ureia por volatilização neste processo.

Os nanocompósitos mostraram comportamento de liberação de ureia mais lento com relação ao material puro, retendo o composto de interesse por maiores tempos. O material que obteve maior retenção da ureia foi o MMT/Ur 1:4/Pf, o retardo na liberação se deve à estrutura polimérica formada, que necessita ser quebrada para solubilização.

Diferentes estruturas nanocompósitos de MMT/ureia destinadas a liberação lenta de nitrogênio exibiram efeito benéfico sobre a digestibilidade da cana de açúcar, que é considerada uma forragem de baixa qualidade e de difícil digestão. Todas as amostras apresentaram ganhos percentuais de digestibilidade da cana em relação ao material puro. No entanto, o nanocompósito com 2% de hidrogel (m/m) demonstrou-se mais eficaz para fins de nutrição animal devido a adsorção de íons  $\text{NH}_4^+$  durante o processo de síntese microbiana, que é benéfico, principalmente por causa da redução de toxicidade de  $\text{NH}_3$  e manutenção, de liberação lenta, de conteúdo mais constante N no rúmen. Apesar do aumento constatado para a digestibilidade estar acordo com os testes de liberação de ureia em meio aquoso, o ganho na digestibilidade foi menos expressivo para os nanocompósitos exibindo a cinética de liberação de ureia muito lenta. Os resultados obtidos sugerem que uma taxa ideal de liberação é necessária em conjunto com um ambiente ideal para a síntese microbiana. Estes resultados mostram que o design de nanoestruturas é uma poderosa ferramenta para

incrementar a eficiência das forragens convencionais, tais como a ureia, e possivelmente servir como uma base para futuros testes *in vivo*.

## 6. PRODUÇÕES CIENTÍFICAS REFERENTES AO TRABALHO DE MESTRADO

### **Insights into nutritional effects of slow-release nitrogen MMT/Urea nanocomposites on animal feed by *in vitro* approach**

*Camila C. T. da Cruz<sup>a, b</sup>, Elaine I. Pereira<sup>c</sup>, Patricia S. Sato<sup>a, b</sup>, Gilberto B. de Souza<sup>c</sup>, Alberto C. C. Bernardi<sup>c</sup>, Caue Ribeiro<sup>\*, b</sup>*

<sup>a</sup>Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, Washington Luiz Hwy., Km 235, São Carlos, São Paulo, 13565-905, Brazil.

<sup>b</sup>EMBRAPA Instrumentation. 1452 XV de Novembro Street, São Carlos, São Paulo, 13560-970, Brazil.

<sup>c</sup>EMBRAPA Southeast Livestock, Washington Luiz Hwy., km 234, São Carlos, São Paulo 13560-970, Brazil.

## 7. REREFÊNCIAS

AHMADI, S.J., YUDONG, H., LI, W. Synthesis of EPDM/Organoclay Nanocomposites: Effect of the Clay Exfoliation on Structure and Physical Properties. *Iran. Polym. J.*, 13: 415-422, 2004.

ALVES, E.M. Farelo da vagem de algaroba associado a níveis de ureia na alimentação de ovinos: balanço de nitrogênio, N-ureico no plasma e parâmetros ruminais. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, Maringá., 34, n. 3: p. 287-295, 2012.

ANKOM, Technology. Method 3: In vitro true digestibility using the Daisyii Incubator. Disponível em: [http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD\\_0805\\_D200.pdf](http://www.ankom.com/media/documents/IVDMD_0805_D200.pdf). Acesso em Abril de agosto de 2015.

BANDA, M.; VALDEZ, R. E. Effect of stage of maturity on nutritive value of sugarcane. *Tropical Animal Production.*, 1:94-97, 1976.

BORTOLIN, A.; AOUADA, F. A.; MOURA, M. R.; RIBEIRO, C.; LONGO, E.; MATTOSO, L. H. C. Application of polysaccharide hydrogels in adsorption and controlled-extended release of fertilizers processes. *J. Appl. Polym. Sci.*,123:2291-2298, 2012,.

BRACK,W., HEINE, B., BIRKHOLO, F., KRUSE , A., SCHOCH , G., TISCHER, S., DEUTSCHMANN, O. Kinetic modeling of urea decomposition based on systematic thermogravimetric analyses of urea and its most important by-products. *Chem. Eng. Sci.*, 106: 1-8, 2014.

CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, P.W.; FERRET, A.; BACH, A. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J. Anim. Sci.*, 86: 702-711, 2008.

CARVALHO, G.J. Avaliação do potencial forrageiro e industrial de variedades de cana-de-açúcar (ciclo de ano) em diferentes épocas de corte. Lavras, Programa de Pós Graduação em Fitotecnia Universidade Federal de Lavras, 1992. Dissertação de Mestrado , 63p.

CHEN, J. P.; ISA, K. Thermal decomposition of urea and urea derivatives by simultaneous TG/(DTA)/MS. *J. Mass Spectrom Soc.*, 46: 299-303, 1998.

CHERDTHONG, A.; WANAPAT, M. Development of Urea Products as Rumen Slow Release Feed for Ruminant Production: A Review. *Aust. J. Basic Appl. Sci.*, 4, 2232-2241, 2010.

CORSI, M. Espécies forrageiras para pastagens. *Pastagens: Fundamentos da Exploração Racional*, Piracicaba., , 185 – 206,1986.

DA SILVA, J.F.C.; LEÃO, M.I. Fundamentos de nutrição dos ruminantes. *Livroceres*. 1979,380. Davis, G.V.; Stallcup, O.T. Influence of dietary nitrogen on nitrogen metabolism in the rumen 1.2. *J. Dairy Sci.*, 47: 1237-1242., 1964.

DAVIS, G.V.; STALLCUP, O.T. Influence of dietary nitrogen on nitrogen metabolism in the rumen 1.2. *J. Dairy Sci.*, 47:1237-1242, 1964.

DEMMENT, M.W.; GREENWOOD, G.B. Forage ingestion: effects of sward characteristics and body size. *J. Animal. Sci.*, 66:2380-2392,1988.

GONÇALVES, C.C.M.; TEIXEIRA, J.C.; SALVADOR, F.M. *Uréia na alimentação de ruminantes*. Boletim de extensão. Lavras – MG: Editora UFLA, 2004. Disponível em:< [www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol\\_101.pdf](http://www.editora.ufla.br/BolExtensao/pdfBE/bol_101.pdf)>. Acesso em: jun. 2015.

GONSALVES J. N .Tipos de uréia e fontes de carboidratos na alimentação de cordeiros. Itaétina , 2011.. Tese ( Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB - Campus de Itapetinga). p.70

GONZÁLEZ, F.H.D. Uso de perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O; OSPINA, H.; RIBEIRO, L.A.O. (Eds). *Perfil Metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais*. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.

HADDAD, C.M. Uréia em suplementos alimentares. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE BOVINOS – Uréia para ruminantes, 2., 1984, Piracicaba. *Anais...* Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz,. p.119-141,1984

HELMER, L.G.; BARTLEY, E.E. Progress in the Utilization of Urea as a Protein Replacer for Ruminants. A Review. *J.Dairy Sci.*, 54:25 – 51,1971.

HOOVER, W.H. Chemical Factors Involved in Ruminant Fiber Digestion. *J. Dairy Sci.*, 69:2755-2766, 1986.

HUNTINGTON, G.B; ARCHIBEQUE, S.L. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *Proc .Am. Soc. Anim. Sci.*, 78:1-11, 1999.

KERTZ, A.F. Urea Feeding to Dairy Cattle: A Historical Perspective and Review. *The Prof. Anim. Sci.*, 26:257-272, 2010.

LENG, R.A; NOLAN, J.V. Nitrogen metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.*,67:1072-1089 ,1984.

LIZARAZO , A.C.; MENDOZA, G.D.; KU, J.; MELGOZA , L.M.; CROSBY, M .Effects of slow-release urea and molasses on ruminal metabolism of lambs fed with low-quality tropical forage. *Small Ruminant Research.*,116 : 28– 31, 2014.

NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *J. Dairy Sci.*, 71: 2070-2107, 1988.

NORTON, B. W. Differences between species in forrage quality. Santa Lúcia, s. d., 89 - 110 p.

OWENS, F.N., BERGEN, W.G. Perspective Current Understanding and Future Implications Nitrogen Metabolism of Ruminant Animals: Historical. *J. Anim Sci*, 1983.

PAIXÃO, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; LEÃO, M.I. Uréia em dietas para bovinos: consumo, digestibilidade dos nutrientes, ganho de peso, características de carcaça e produção microbiana. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, 35: 2451-2460, 2006.

PEARSON RM, SMITH JA. The utilization of urea in the bovine rumen. 2. The conversion of urea to ammonia. *Biochem J.*, 37:148-153, 1943.

PEREIRA, E.I.; MINUSSI, F.B.; DA CRUZ, C.C.T.; BERNARDI, A.C.C.; RIBEIRO, C. Urea montmorillonite extruded nanocomposites: a novel slow-release material. *J. Agr. Food Chem.*, 60:5267-5272, 2012.

PEREIRA, E.I.; CRUZ, C.C.T.; SOLOMON, A; LE, ANH; CAVIGELLI, M; RIBEIRO, C. Novel slow release nanocomposite nitrogen fertilizers: The impact of polymers on nanocomposite properties and function. *Industrial & Engineering Chemistry Research.*, 54:3717-3725, 2015.

PEREIRA, E.S.; QUEIROZ, A.C.; PAULINO, M.F. *et al.* Fontes nitrogenadas e uso de *Sacharomyces cerevisiae* em dietas à base de cana-de-açúcar para novilhos: consumo, digestibilidade, balanço nitrogenado e parâmetros ruminais. *Rev. Bras. Zootec.*,30:563-572, 2001.

PEREIRA, L.G.R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; TOMICH, T.R. Utilização da uréia na alimentação de ruminantes no semi-árido. *Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia*, 45., 2008, Lavras. Biotecnologia e sustentabilidade:

anais. Lavras: UFLA: SBZ, 2008. Embrapa Semiárido - Artigo em anais de congresso

PEREZ, J. R. O. Sistemas para a estimativa de digestibilidade in vitro. Simpósio Internacional de Digestibilidade em Ruminantes, Lavras., 55 – 68, 1997.

REID, J.T. Urea as a protein replacement for ruminants: a review. *J. Dairy Sci.*, 36: 955-996, 1953.

REIS, R. A.; RODRIGUES, L. R. A. Valor nutritivo de plantas forrageiras. Jaboticabal., 26,1993.

RUMSEY, D. Estatística II para leigos. Editora alta books. Rio de Janeiro,2003

SALMAN, A. K. D.; MATARAZZO, S. V.; EZEQUIEL, J. M. B. et al. Estudo do balanço nitrogenado e da digestibilidade da matéria seca e da proteína de rações para ovinos suplementados com amiréia, uréia ou farelo de algodão: reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 33, 1996, Fortaleza. Anais... Fortaleza: SBZ, 1996. p.197-199.

SANTOS, G.T.; CAVALIERI, F.L.B.; MODESTO, E.C. Recentes Avanços em Nitrogênio não Protéico na Nutrição de Vacas Leiteiras. In: SINLEITE–SIMPÓSIO INTERNACIONAL EM BOVINOCULTURA DE LEITE - Novos Conceitos em Nutrição, 2., 2001, Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. p.199-228.

SATTER, L.D; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Brit. J. Nutr*, 32:199-208.,1974.

SATTER, L.D.; ROFFLER, R.E. NITROGEN requirements and utilization in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.*,58:1212-37, 1979.

SOUZA SANTOS, P. de. Tecnologia de Argilas Aplicadas a Argilas Brasileiras. São Paulo , Edgard Bucher Ltda, 1975 a .v. 1.

TEIXEIRA, J. C. Nutrição de ruminantes. Edições FAEPE. Lavras- MG., 239 p,1992.

TOWNSEND, C.R.; COSTA, N.L.; PEREIRA, R.G.A. Ureia pecuária: alternativa para a produção de carne e leite em Rondônia. Embrapa circular técnica., 37:23, 1998.

VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press. 476p, 1994.



VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy. Sci.*,74, 3583-3597, 1991.

VILELA, H; SILVESTRE, J.R.A. Uréia para ruminantes. Belo Horizonte: EMATER-MG, 1984. 46p. (EMATER-MG. Boletim Técnico, 23).

ZHANG, Y., LIU, Q., WU, Z., ZHANG, Y. Thermal behavior analysis of two bentonite samples selected from China. *J. Therm Anal Calorim* . 121:1287-1295, 2015,.

ZONTA, A.; ZONTA, M.C.M. Suplementação proteica durante o período seco. *Pesquisa & Tecnologia.*, 8:103, 2011.

WITH, T. K.; PETERSEN, B.; PETERSEN, T. D. A simple spectrophotometric method for the determination of urea in blood and urine. *J.Clin.Pathol.*, 14:202-204, 1961,.

YAMAMOTO, C. F.; PEREIRA, E.I.; MATTOSO, L.H.C.; MATSUNAKA, T.; RIBEIRO, C. Slow Release fertilizers based on Urea/Urea-formaldehyde polymer nanocomposites. *J. Control Release*. 2015 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2015.11.023>).