

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE UREAS DE LENTA LIBERACIÓN  
PARA RUMIANTES**

**PRESENTA**

**GUSTAVO SOBREVILLA HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER  
EL GRADO DE MAestrÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**NOVIEMBRE, 2018**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**  
**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**



**TESIS**

**EVALUACIÓN IN VITRO DE UREA DE LENTA LIBERACIÓN PARA RUMIANTES**

**PRESENTA**

**MVZ. GUSTAVO SOBREVILLA HERNÁNDEZ**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE**

**MAESTRÍA EN CIENCIA ANIMAL**

**GENERAL ESCOBEDO, NUEVO LEÓN, MÉXICO**

**NOVIEMBRE DE 2018**

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE UREA DE LENTA LIBERACIÓN PARA  
RUMIANTES**

**TESIS QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA  
EN CIENCIA ANIMAL**

**PRESENTA**

**GUSTAVO SOBREVILLA HERNÁNDEZ**



Dr. Héctor Fimbres Durazo  
Director



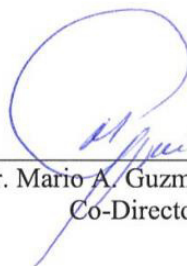
Ph.D. Jorge R. Kawas Garza  
Co-Director



MC. Gustavo Moreno Degollado  
Co-Director



Dr. Argelio Santos Halisak  
Co-Director

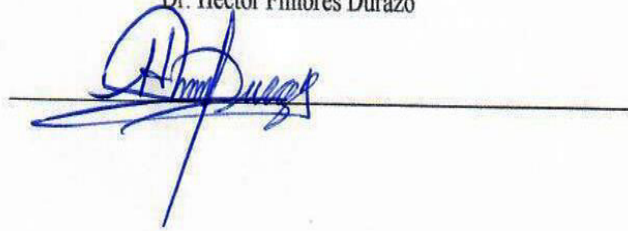


Dr. Mario A. Guzmán García  
Co-Director

## EVALUACIÓN *IN VITRO* DE UREA DE LENTA LIBERACIÓN PARA RUMIANTES

Este trabajo fue realizado en el Centro de exposiciones agropecuarias del CIPA (Centro de Investigación en Producción Agropecuaria) de la Universidad Autónoma de Nuevo León y el Laboratorios de Nutrición Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de Dr. Héctor Fimbres Durazo.

Dr. Héctor Fimbres Durazo



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mi familia en especial a mis padres Mirna Ruth Hernández Silva y Gustavo Sobrevilla Badillo que me apoyaron incondicional para seguirme preparando profesionalmente.

También agradezco a todos y cada uno de los profesores del Posgrado Conjunto Agronomía-Veterinaria, de la Universidad Autónoma de Nuevo León, así mismo a mis compañeros, por todo su apoyo, en especial a mis asesores de tesis.

Al Dr. Héctor Fimbres Durazo, por sus consejos y apoyos en la redacción del presente trabajo.

Al Ph.D. Jorge R. Kawas Garza, por darme esta oportunidad tan importante en mi vida profesional, además de sus enseñanzas tanto en lo profesional como en lo personal.

A los profesores, MC. Gustavo Moreno Degollado y Dr. Argelio Santos Haliscak, por su aporte para la culminación del presente trabajo.

Al Dr. Mario A. Guzmán García por ayudarme y enseñarme técnicas de cirugía experimental indispensables para la realización de mi trabajo experimental.

De la misma manera quiero agradecer al personal del Laboratorio de Nutrición animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, entre ellos, a la T.L. María Julia Arteaga por brindarme su apoyo para realizar los análisis de laboratorio, así también a los ayudantes y compañeros, Jocelyn C. López Puga, MVZ. Diana Salas y al Ing. Alvin Carrillo, por su ayuda durante todo el estudio.

También agradezco a las empresas MNA de México, S.A. de C.V., que me apoyaron en todo este proceso, y me prestaron material y equipo, y al CIPA (Centro de Investigación en Producción Agropecuaria) por dejarme utilizar parte de sus instalaciones para realizar este trabajo.

## NOMENCLATURAS

°C	Grados centígrados
μl	Microlitros
μg	Microgramos
Ba <sup>2+</sup>	Ion de bario
Ca	Calcio
Cd <sup>2+</sup>	Ion de cadmio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Cu	Cobre
Cu <sup>2+</sup>	Ion de cobre
DIV	Degradabilidad <i>in vitro</i>
Fe	Hierro
g	Gramos
h	Horas
mg	Miligramos
Mn <sup>2+</sup>	Ion manganeso
N	Nitrógeno
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido
NH <sub>3</sub> -N	Nitrógeno amoniacal
NH <sub>3</sub>	Amoniac
NH <sub>4</sub>	Amonio
Ni <sup>2+</sup>	Ion níquel
nm	Nanometros
NNP	Nitrógeno no proteico

P

Fósforo

pH

Potencial de hidrógeno

Zn

Zinc

Zn<sup>2+</sup>

Ion de zinc

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	1
SUMMARY .....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVOS.....	5
HIPÓTESIS .....	5
JUSTIFICACIÓN.....	5
REVISIÓN DE LITERATURA .....	7
3.1. Antecedentes históricos .....	7
3.2. Metabolismo de la urea en el rumen .....	7
3.3. Bacterias ureolíticas en el rumen .....	8
3.4. Ureasas bacterianas .....	10
3.5. Utilización del amoníaco .....	11
3.6. Absorción del amoniaco .....	13
3.7. Toxicidad de la urea.....	14
3.8. Encapsulación en nutrición animal .....	14
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	23
CONCLUSIONES.....	32
BIBLIOGRAFÍA .....	33



## ÍNDICE DE CUADROS

	Página.
Cuadro 1. Ingredientes y composición química de la ración base.	18
Cuadro 2. Composición química de las fuentes de NNP y proteína verdadera utilizadas en los experimentos <i>in vitro</i> .	19
Cuadro 3. Correlación entre degradabilidad y producción de NH <sub>3</sub> -N de cada sustrato a través del tiempo.	26
Cuadro 4. Diferencias en producción de NH <sub>3</sub> -N intra-sustrato a través del tiempo.	30

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página.
Figura 1. Influencia del tipo de lavado posterior a la incubación en DIV (%) de pasta de soya, urea común y productos comerciales de urea de lenta liberación (ULL; Optigen II®).	23
Figura 2. Degradabilidad <i>in vitro</i> a distintos tiempos de incubación de los sustratos (ULL1, Optigen II®; ULL2, Rumate®; UC, urea común; PS, pasta de soya) enjuagados con una piseta después de la incubación.	25
Figura 3. Producción de N-NH <sub>3</sub> <i>in vitro</i> de los sustratos (ULL1, Optigen II®; ULL2, Rumate®; UC, urea común; PS, pasta de soya), a diferentes tiempos de incubación.	27
Figura 4. Liberación de NH <sub>3</sub> -N de los distintos sustratos durante las primeras horas de incubación <i>in vitro</i> .	28

## RESUMEN

En la alimentación de rumiantes, el uso de nitrógeno no proteico (NNP) como fuente de proteína cruda es posible dado que las bacterias ruminales son capaces de utilizar el nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) para formar proteína microbiana. Sin embargo, su utilización por parte de los microorganismos ruminales es muy ineficiente, ya que se hidrolizan rápidamente en el rumen. El recubrimiento de las partículas de urea con compuestos lipídicos o polímeros podría reducir la tasa de liberación ruminal, y así permitir una mayor utilización del  $\text{NH}_3\text{-N}$ . para evaluar la eficiencia de estos recubrimientos, se diseñaron dos experimentos *in vitro*, midiendo la tasa de degradabilidad *in vitro* (Experimento 1) y la liberación de  $\text{NH}_3\text{-N}$  (Experimento 2) de dos productos comerciales, a distintos periodos de incubación. La diferencia en degradabilidad de los sustratos (PS, UC, ULL1 y ULL2), así como sus cambios a través del tiempo, fueron diferentes ( $P < 0.001$ ), teniendo las ULL una degradabilidad intermedia entre la UC y PS. Existe una correlación positiva ( $P < 0.0001$ ) entre degradabilidad de la materia seca y la producción de  $\text{NH}_3\text{-N}$  ( $P < 0.01$ ) de las ULL, considerando los distintos periodos de incubación. Las bajas concentraciones ( $P < 0.001$ ) de  $\text{N-NH}_3$  ( $6.7 \pm 3.6$ ) obtenidas en este estudio pueden estar relacionadas con el tipo de recubrimiento de ULL1 y ULL2, principalmente durante las primeras 4 h. Ambos recubrimientos de las fuentes comerciales de urea redujeron la liberación del  $\text{NH}_3\text{-N}$  en comparación con la urea sin recubrimiento. Este comportamiento no se observó bajo condiciones de incubación *in vitro*.

## SUMMARY

In ruminant production systems, the use of urea as a non-protein nitrogen (NPN) source is possible since ruminal bacteria are able to use ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) to synthesis microbial protein. However, its use by rumen microorganisms is very inefficient since urea is hydrolyze rapidly in the rumen. Coating urea particles with lipid compounds or polymers could reduce the rate of ruminal release of urea, allowing for a greater use of  $\text{NH}_3\text{-N}$ . Two *in vitro* experiments were conducted, the first, to determine the degradation rate of two commercial slow-release urea products (Exp. 1) and the second to measure the release of  $\text{NH}_3\text{-N}$  (Exp. 2) of both products, at different periods of incubation. Both, degradation rate and  $\text{NH}_3\text{-N}$  release were different ( $P < 0.001$ ) over time for the different substrates. *In vitro* degradability was intermediate for ULL, with UC being more degradable and PS being the least degraded. A positive correlation was obtained between degradation rate and  $\text{NH}_3\text{-N}$  production ( $P < 0.01$ ) for the ULL products. The low *in vitro*  $\text{NH}_3\text{-N}$  concentrations ( $6.7 \pm 3.6$ ) found in this study may be related to the type of lipid or polymer used to cover both commercial slow-release urea products during the first 4 h. Slow-release urea products had less *in vitro*  $\text{NH}_3\text{-N}$  released compared to uncoated urea.

## INTRODUCCIÓN

En la formulación de dietas para rumiantes, el contenido de proteína cruda se obtiene de fuentes de proteína verdadera, así como de fuentes de nitrógeno no-proteico (NNP). El uso de estas últimas se basa en la capacidad de los microorganismos del rumen en utilizar ese nitrógeno (N) para la síntesis de proteína microbiana (Marichal *et al.*, 2009; Galo *et al.*, 2003; Van Soest, 1991).

La urea contiene una alta concentración de N (45%) y es la fuente de NNP más utilizada en la formulación de raciones para rumiantes (Holder, 2012). La urea se solubiliza e hidroliza para producir amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en el rumen, bajo la acción de la ureasa bacteriana (Holder, 2012; Satter y Slyter, 1974).

La urea en la dieta se hidroliza rápidamente cuando entra al rumen, lo que resulta en un pico de las concentraciones de nitrógeno amoniacal ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) dentro de la primera hora después de su consumo (Taylor-Edwards *et al.*, 2009). Se han buscado numerosas vías para facilitar la sincronía de la disponibilidad de N y la degradación de los carbohidratos (Ludden *et al.*, 2000; Whitelaw *et al.*, 1991). Una solución alternativa podría ser modificar la urea para controlar su velocidad de liberación, de modo que la liberación de  $\text{NH}_3\text{-N}$  suceda a la par de la digestión de carbohidratos (Oltjen *et al.*, 1968; Males *et al.*, 1979; Owens *et al.*, 1980).

Los primeros productos de urea de lenta liberación incluyeron a la Starea, un producto producido por la cocción de los granos y urea para formar un producto que degrada más lentamente (Deyoe *et al.*, 1968), el fosfato de urea (Oltjen *et al.*, 1968) y el biuret. El biuret es un compuesto ampliamente estudiado desde la década de 1970 que se forma por la condensación

de dos moléculas de urea (Fonnesbeck *et al.*, 1975), y urea unida a cloruro de calcio (Huntington *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha demostrado que la urea recubierta con una capa lipídica o de un polímero, reduce las concentraciones de  $\text{NH}_3\text{-N}$  ruminal en comparación con la urea común (Taylor-Edwards *et al.*, 2009). Consecuentemente, recubrir con polímero o grasa a la urea puede resultar en una mejor utilización de esta, en comparación con la urea común, cuando se agrega a las dietas deficientes en proteína. Sin embargo, resultados variables se han obtenido con la inclusión de urea de lenta liberación a dietas del ganado bovino (Ceconi *et al.*, 2015; López-Soto *et al.*, 2014; Bourg *et al.*, 2012; Taylor-Edwards *et al.*, 2009).

Aunque existe información de la respuesta animal por la inclusión de urea de lenta liberación (Marichal *et al.*, 2009; Mascardi, 2007; Harrison y Karenzos, 2005; Taylor *et al.*, 2005; Galo *et al.*, 2003), pocos estudios han evaluado la eficacia de las coberturas de base lipídica o polimérica para la liberación gradual de la urea in vitro.

## **OBJETIVOS**

Evaluar la degradabilidad *in vitro* de productos comerciales de ureas de lenta liberación, urea común grado alimenticio y pasta de soya.

Evaluar la liberación de amoníaco *in vitro* de productos comerciales de ureas de lenta liberación, urea común de grado alimenticio y pasta de soya.

## **HIPÓTESIS**

La urea de lenta liberación recubierta con capa lipídica o polimérica, tendrá una degradabilidad y liberación de amoníaco *in vitro* más lenta que la urea común y similar a fuentes de proteína verdadera como la pasta de soya.

## **JUSTIFICACIÓN**

El uso de un recubrimiento de la urea a base de polímeros biodegradables y/o grasas para reducir la degradación de la urea en la alimentación de rumiantes es una tecnología factible para reducir la su degradabilidad en el rumen, y así hacer que el  $\text{NH}_3\text{-N}$  producido en la hidrólisis de la misma sea mejor aprovechado por las bacterias que ahí habitan, para sintetizar proteína microbiana. Existen en el mercado productos de este tipo, los cuales han sido evaluados anteriormente con resultados variables. Esto puede deberse a distintos factores como el tipo de recubrimiento, las condiciones de experimentación, el tipo de dieta utilizada, entre otros. La utilización de modelos *in vitro* nos permite simular las condiciones ruminales y así descartar los

tratamientos con pocas probabilidades de éxito y reducir la utilización de gran número de animales en experimentación, teniendo como consecuencia la reducción de costos de investigación.



## **REVISIÓN DE LITERATURA**

### **3.1. Antecedentes históricos**

La utilización de NNP por los rumiantes como una fuente útil de N ha sido reconocida desde hace más de 100 años (Holder, 2012; Zuntz, 1891). A partir de la década de 1940, la utilización de la urea en la alimentación de los rumiantes se extendió debido a la escasez de materias primas proteicas por la Segunda Guerra Mundial (Marín y Andrés, 2009; Fonnesbeck *et al.*, 1975), y en las décadas siguientes, su uso permitió reducir significativamente la utilización de la harina de soya y otras fuentes de proteína en las dietas. Sin embargo, la urea es utilizada menos eficientemente por los rumiantes en comparación con otras fuentes que contienen proteína verdadera (Broderick *et al.*, 2009).

### **3.2. Metabolismo de la urea en el rumen**

La urea llega al rumen a través de la dieta o por el reciclaje a través de la pared ruminal y secreción salival. La transferencia de urea al rumen se produce por difusión simple a lo largo del gradiente de concentración, que es muy variable dependiendo de los factores ambientales, de la dieta y del rumen (Owens y Bergen, 1983). Los principales factores dietéticos, fisiológicos y del ambiente ruminal que regulan la producción de urea hepática que regresa al intestino y el movimiento transepitelial de la urea en el rumen, incluyen el consumo de carbohidratos altamente fermentables, la digestibilidad de la materia orgánica, las concentraciones de amoníaco y ácido butírico, la actividad de la ureasa, el CO<sub>2</sub> y el pH ruminal, y la concentración

de urea en el plasma (Kennedy y Milligan, 1980). La mayor actividad de la ureasa, el ácido butírico y el CO<sub>2</sub> aumentan el transporte de urea a través de la pared del rumen (Abdoun, 2010).

El transporte a través del epitelio ruminal también está mediado a través de transportadores de urea en la membrana luminal y basolateral del epitelio (Abdoun *et al.*, 2006). Los transportadores de urea en la pared del rumen se expresan diferencialmente dependiendo de la concentración de N en la dieta (Marini y Amburgh, 2003). En los rumiantes, la cantidad de urea reciclada en el intestino varía entre 29 y 99% y la transferencia de N a través del intestino puede ser mucho mayor que el N ingerido (Kiran y Mutsvangwa, 2007).

La contribución del flujo salivar a la entrada de urea en el rumen puede variar entre el 15% y 100% dependiendo del tipo de dieta (Lapierre y Lobley, 2001). Dependiendo de los factores dietéticos y ruminales, del 19 al 96% de la producción de urea endógena puede ser reciclada al intestino, y del 15 al 94% del reciclaje puede ser transferido en la saliva (Huntington y Archibeque, 2000). El porcentaje de flujo salivar de urea al rumen es de 36% cuando se alimenta con forraje (Taniguchi *et al.*, 1995) y 16% con concentrado (Guerino *et al.*, 1991). La urea excretada en la orina representa del 25 al 60% de la producción de urea endógena en rumiantes (Huntington y Archibeque, 2000).

### **3.3. Bacterias ureolíticas en el rumen**

El amoníaco también se deriva de la degradación de la proteína dietética dependiendo de la fuente. Los grupos amino también se obtienen de aminoácidos y de proteínas intactas y son utilizados por bacterias de la misma manera. La solubilidad de las proteínas naturales varía mucho, y por lo tanto, la velocidad a la que son hidrolizadas por las bacterias difiere

significativamente. Para las proteínas menos solubles, el proceso de liberación de amoníaco es mucho menos rápido y proporciones bastante grandes de la proteína pueden pasar a través del rumen hasta el abomaso sin descomponerse (Parta, 2015). Se conocen varias bacterias ruminales que degradan proteínas tales como *Prevotella ruminicola*, *Ruminobacter amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium*, *Prevotella bryantii* y *Streptococcus bovis*, y bacterias fermentadoras de aminoácidos como *Clostridium aminophilum*, *Clostridium sticklandii*, *Megasphaera elsdenii*, *Prevotella ruminicola*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium* y *Streptococcus bovis* (Russell, 1998; Wallace, 1996).

La degradación de la proteína de los alimentos y la depredación de las bacterias por los protozoos, podrían desempeñar un papel importante en la degradación de las proteínas en el rumen, influyendo en la concentración de amoníaco en el rumen (Wallace *et al.*, 1987). La inhibición del crecimiento de las bacterias degradadoras de proteínas y de los protozoos puede disminuir la degradación y el metabolismo de la proteína en el rumen, por lo tanto, la concentración de amoníaco ruminal (Patra y Saxena, 2009; Patra y Yu, 2014).

Para entender como la urea es utilizada para substituir a las proteínas en la dieta de rumiantes, se demostró la importancia de aislar los microorganismos con actividad ureolítica que hidrolizan la urea, para tener una mejor comprensión del metabolismo de esta en el rumen (Appleby, 1955).

Se pensaba que la actividad de la ureasa estaba confinada a especies de *Staphylococcus*, *Lactobacillus casei* y *Klebsiella aerogenes*, sin embargo, la cepa ureolítica de *Streptococcus faecium* tuvo una mayor actividad ureasa que las otras bacterias que ocurren en mayor número

y poseía actividad de la ureasa es suficiente para dar cuenta de la mayor parte de la actividad ureolítica del rumen de las ovejas alimentadas con forraje (Cook, 1976).

Los cocos gram positivos anaeróbicos facultativos como *Staphylococcus saprophyticus* y *Micrococcus varians* fueron probablemente responsables de una gran proporción de la actividad ureasa del líquido ruminal (Van Wyk y Steyn, 1975). En rumiantes domésticos y salvajes, el 56.7% de las cepas de *Selenomonas ruminantium* y el 18.5% de los lactobacilos, tienen actividad ureolítica media.

### **3.4. Ureasas bacterianas**

Al entrar en el rumen, la urea se hidrolizada rápidamente en  $\text{NH}_3\text{-N}$  entre 30 min y 2 h por la enzima ureasa producida por los microorganismos ruminales (Rekib y Sadhu, 1986). La actividad de la ureasa depende de la concentración de urea que entra en el rumen. Se ha observado que la magnitud de la actividad ureolítica era una función directa de las cantidades de urea consumida por el animal. La actividad ureolítica puede ser reprimida con altas concentraciones de amoníaco y fuentes orgánicas complejas de nitrógeno en el líquido ruminal (Puniya *et al.*, 2015).

Existe evidencia de que la glutamina sintetasa puede regular la producción de ureasa. En general, la actividad de la ureasa ruminal aumentó de 2 a 6 h después de la alimentación, con aumentos mayores con dietas a base de forraje (Smith y Bryant, 1979). La actividad de la ureasa ruminal es estimulada por una serie de iones inorgánicos como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Ba}^{2+}$ , sin embargo, es inhibida por  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  (Spears y Hatfield, 1978). La actividad de la ureasa se localiza

principalmente en el epitelio de la pared ruminal con bacterias adherentes, así como en el líquido ruminal (Rybosová *et al.*, 1984).

La actividad ureolítica de las bacterias adheridas a la pared del rumen, es uno de los mecanismos parciales de la hidrólisis del  $\text{NH}_3\text{-N}$ , en dietas con bajo contenido de nitrógeno, este mecanismo facilita la entrada de  $\text{NH}_3\text{-N}$  al rumen a través de la pared ruminal y es reutilizada en la mucosa ruminal (Puniya *et al.*, 2015).

### **3.5. Utilización del amoníaco**

La síntesis de proteínas en el rumen por microorganismos se debe en parte a que el amoníaco puede ser utilizado por las bacterias para la síntesis de los aminoácidos necesarios para su crecimiento, y está estrechamente asociada con la actividad de estos mismos organismos en la degradación de la celulosa y otros carbohidratos, y en la formación de ácidos orgánicos como subproductos de este proceso de fermentación. Sin embargo, hay pruebas de que una proporción bastante alta de las proteínas más solubles, como la caseína, será utilizada por las bacterias de la misma manera que el amoníaco de la urea (Puniya *et al.*, 2015).

La utilización de amoníaco para producir proteína bacteriana en el rumen depende de la energía, por lo cual, proporcionar la energía necesaria que esté disponible en el rumen, se asocia con menor concentración de N de amoníaco ruminal y, en consecuencia, aumento de la síntesis de proteínas microbianas (Puniya *et al.*, 2015).

La utilización de amoníaco para la síntesis de aminoácidos por microorganismos ruminales implica reacciones de desaminación y transaminación. Cuando las actividades de las enzimas que participan en la producción de amoníaco (ureasa, NAD y glutamato

deshidrogenasas unidas al NADP) exceden las actividades de las enzimas relacionadas con la utilización de amoníaco (glutamina sintetasa, carbamil fosfoquinasa y glutamato deshidrogenasas unidas a NADH y NADPH), la concentración de amoníaco en el rumen aumenta (Puniya *et al.*, 2015). La utilización de amoníaco ruminal también está controlada por otros factores como la disponibilidad de energía y cofactores, los niveles de sustrato y la permeabilidad de las células bacterianas (Allison, 1969). Dado que los ácidos grasos volátiles de cadena ramificada se producen en el rumen principalmente de la degradación de la proteína de los alimentos y la desaminación de aminoácidos de cadena ramificada, el consumo de alimentos sin proteína puede causar deficiencia en estos ácidos (Oltjen, 1969).

Las concentraciones algunos ácidos grasos volátiles como ácido isobutirico y ácido isovalerico generalmente disminuyen debido a la alimentación con urea. Con dietas que contienen urea, el fluido ruminal contiene más ácidos grasos volátiles totales, pero una menor concentración molar de ácido isobutirico y ácido isovalerico (Czerkawski y Breckenridge, 1982). Los microorganismos del rumen tienen vías similares a las del Ciclo de Krebs, que proporcionan esqueletos de carbono para la síntesis de aminoácidos (Allison, 1969). Sin embargo, para la síntesis de algunos aminoácidos, se requieren fuentes específicas de carbono, por ejemplo, el isobutirato, el fenilacetato, el índole-3-acetato, el isovalerato y el 2-metilbutirato, los cuales son precursores de valina, fenilalanina, triptófano, leucina e isoleucina, respectivamente (Allison, 1969). Cuando la urea es la principal fuente de nitrógeno en la dieta, la energía, los esqueletos de carbono y los cofactores necesarios para la biosíntesis de aminoácidos pueden ser necesarios en mayores cantidades.

### 3.6. Absorción del amoníaco

La absorción de amoníaco se produce en forma lipófila como amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) por vía de difusión simple, cuya magnitud está linealmente relacionada con el pH del líquido ruminal a valores de pH superiores a 7, sin embargo, se absorbe predominantemente como ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) a través de canales de potasio en la membrana apical (Abdoun *et al.*, 2006). A pH ruminal normal, el  $\text{NH}_4^+$  se convierte en  $\text{NH}_3$  en el sitio de entrada del epitelio ruminal, antes de ser absorbido a la sangre portal. La absorción de  $\text{NH}_4^+$  puede ocurrir a través de algunas proteínas de transporte y el movimiento de  $\text{NH}_4^+$  a través del epitelio ruminal es probablemente regulado por gradientes electroquímicos (Abdoun *et al.*, 2007). La absorción de ambas formas de amoníaco a través de la pared ruminal aumenta con el aumento del pH ruminal y las concentraciones totales de amoníaco. Por lo tanto, las velocidades relativas de transporte de  $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$  están determinadas por el pH ruminal (Abdoun *et al.*, 2006). A pH ruminal de 6.5 o menor, como en la mayoría de las condiciones de alimentación intensiva, la mayor parte del amoníaco se absorbe en forma de ion amonio (Abdoun *et al.*, 2007). El amoníaco se absorbe a través de todas las secciones del intestino y en promedio el 67 % del  $\text{NH}_3\text{-N}$  es absorbido en el retículo-rumen, y el 33% restante en el intestino (Reynolds y Huntington, 1988). Esto varía considerablemente dependiendo de la composición química de la dieta (Parker *et al.*, 1995). El amoníaco absorbido a través de la pared ruminal a la sangre de la vena porta, contribuye con hasta el 50% del flujo total de amoníaco al hígado (Parker *et al.*, 1995). La cantidad de amoníaco adsorbida a través de la pared ruminal está determinada principalmente por factores de la dieta y ruminales, siendo los factores más importantes la proteína de la dieta que se degradada en el rumen, las contribuciones de la urea endógena al amoníaco ruminal, y la energía disponible en el rumen (Reynolds y Kristensen, 2008).

### **3.7. Toxicidad de la urea**

Cualquier compuesto que forme amoníaco en el rumen ejerce efectos tóxicos si el nivel de amoníaco es excesivo, de manera que la tasa de absorción de amoníaco del rumen excede la capacidad del hígado para eliminar el amoníaco de la sangre, lo que conduce a un aumento de amoníaco en la sangre periférica a un nivel de más de 10  $\mu\text{g/ml}$  (McDonald, 1958). La toxicidad del  $\text{NH}_3\text{-N}$  en los rumiantes puede atribuirse a un efecto tóxico directo del ion amonio en los sistemas corporales (Lewis, 1960). Además, una alteración del equilibrio ácido-base y un cambio en los equilibrios electrolíticos debidos a altas concentraciones de amoníaco en la sangre pueden modificar los signos de toxicidad (Lewis, 1960).

### **3.8. Encapsulación en nutrición animal**

La industria de la nutrición animal ha incorporado en sus procesos la tecnología de encapsulación. La aplicación de esta técnica representa una potencial herramienta para mejorar la salud animal y asegurar una adecuada calidad biológica de los productos destinados al consumo humano (Valenzuela *et al.*, 2013). En nutrición, la encapsulación es una técnica seleccionada por varios motivos, algunos de los cuales son: (1) Puede proteger el material núcleo de su degradación, oxidación, disminución de su actividad específica, o la degradación bacteriana después de mezclarse en un alimento, obteniendo productos alimenticios con mejores características sensoriales y nutricionales, como también aumentar la estabilidad de ciertas sustancias bioactivas durante el procesamiento; (2) Genera reducción de su reactividad con el ambiente durante el paso por el tracto gastrointestinal en animales no-rumiantes y una especie de sobrepaso ruminal para animales rumiantes, incrementando la biodisponibilidad de algunos compuestos activos; (3) Pueden utilizarse para controlar la liberación de una sustancia, de forma



de entregarla a un sitio específico en el tracto gastrointestinal para que ejerza su acción; (4) Las características físicas del compuesto activo pueden ser modificadas, por ejemplo, pudiendo pasar de líquidos a sólidos con la utilización atomización o liofilización, lo que facilita su incorporación en suplementos, dietas, y raciones; también incrementa la aceptabilidad, palatabilidad y consumo de alimentos concentrados para animales; y (5) Evita cambios organolépticos en los alimentos, permite la entrega de moléculas bioactivas de rápida degradación a través de los alimentos, agua de bebida o suplementación oral, cuyo principal objetivo es la protección de éstas moléculas y células, como también la entrega controlada a un sitio específico del tracto gastrointestinal (Augustin y Hemar, 2009).

Las vitaminas son encapsuladas para extender su vida útil y evitar su oxidación y reacciones con otros compuestos de la dieta como minerales traza u otras vitaminas que disminuyen su biodisponibilidad (Marchetti *et al.*, 1995). También las protege de los daños causados por el calor y el vapor en variados procesos tecnológicos como el de extrusión (Li *et al.*, 1996). Una segunda razón para encapsular vitaminas es evitar su degradación en el rumen por las bacterias ruminales (Sacadura *et al.*, 2008).

Algunos minerales con baja biodisponibilidad debido a su alto nivel de interacción durante el paso por el tracto gastrointestinal o por algunos factores intraluminales que afectan su absorción como es el caso del Cu, Zn, Ca y Fe, al ser encapsulados, aumentan significativamente su biodisponibilidad (Wang *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2013).

Otro compuesto bastante estudiado en nutrición de rumiantes es la urea encapsulada o también llamada urea protegida, debido a la lenta liberación del amoníaco en el rumen, disminuyendo las altas concentraciones postprandiales de este compuesto, que conducen a su

ineficiente utilización por microorganismos ruminales, y el aumento de su absorción a nivel ruminal, que puede terminar en cuadros de intoxicación por urea. Por otra parte, también tiene la ventaja de disminuir las emisiones de amoníaco al medio ambiente ruminal (Huntington *et al.*, 2006). Actualmente existen productos en el mercado de urea protegida con poliuretano (Xin *et al.*, 2010) o encapsulada con polímeros naturales (Taylor-Edwards *et al.*, 2009).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Dos experimentos *in vitro* fueron realizados en el Laboratorio de Nutrición y Metabolismo Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Nuevo León, para determinar la degradabilidad (Experimento 1) y la liberación de NH<sub>3</sub> (Experimento 2) de la pasta de soya, urea común y dos fuentes de urea de lenta liberación.

### *Animales, dieta y obtención de líquido ruminal*

Para estos estudios se utilizó líquido ruminal de un toro Beefmaster de 520 kg de peso vivo con fistula ruminal. El animal fue alojado en un corral individual de 5 m x 3.5 m. El toro fue alimentado con una ración completa con aproximadamente 16% de PC (Tabla 1) y tuvo agua disponible a libre acceso. La dieta fue ofrecida dos veces al día, a las 9:00 y 17:00. El toro fue adaptado a la dieta durante 14 días antes de la obtención del líquido ruminal. El líquido ruminal fue obtenido a las 8:00, filtrado a través de dos capas de estopilla (grado 50) y utilizado inmediatamente después de su colección, en ambos experimentos.

### *Experimento 1*

#### *Degradabilidad in vitro*

La degradabilidad de la pasta de soya (PS), la urea común (UC) y las ureas de lenta liberación (ULL1, Optigen II<sup>®</sup>; Alltech, Inc.; ULL2, Rumate<sup>®</sup>, Agritech) fue determinada *in vitro* a distintos tiempos de incubación en líquido ruminal (Cuadro 2).

**Cuadro 1. Ingredientes y Composición química de la ración base.**

	<b>Concentración</b>
<b>Ingredientes (g/kg)</b>	
Heno de pasto	300
Grano seco de destilería	140
Pasta de soya	75
Maíz molido	400
Melaza	60
Mezcla base*	25
<b>Composición química (base seca)</b>	
Proteína cruda (%)	16.2
Cenizas (%)	5.8
Extracto Etéreo (%)	2.6
Fibra Cruda (%)	10.2
FDNmo (%)	24.1
CNF (%)	41.1
Ca (%)	0.08
P (%)	0.47
Zn (ppm)	51.4
Cu (ppm)	8.5

\*Mezcla base: contiene Ca, Na, P, S, Mg, Fe, Zn, Cu, Co, Se, I, vitaminas A y E, urea, aceite mineral, monensina sódica (1,200 ppm).

Bolsitas de nylon (F57 de Ankom<sup>®</sup>Technology Corp.; Fairport, NY, USA) con 0.5 g de cada uno de los sustratos (3 bolsas de cada sustrato + blanco a cada tiempo), fueron incubadas a 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12 y 24 h, a una temperatura de 39.5 °C, con movimiento rotatorio constante, usando una incubadora DAISYII (Ankom<sup>®</sup>Technology Corp.; Fairport, NY, USA) para simular las condiciones ruminales. Después de la incubación, las bolsitas de nylon fueron enjuagadas manualmente con una piseta durante no más de 20 segundos para evitar la pérdida de muestra por el lavado y secadas a 60°C durante 24 h para eliminar la humedad restante.

## Experimento 2

### Determinación *in vitro* de nitrógeno amoniacal (NH<sub>3</sub>- N)

La liberación de amoníaco de la pasta de soya, la urea común y las fuentes comerciales de urea de lenta liberación fue determinada *in vitro* a distintos tiempos de incubación mediante espectrofotometría (Broderick y Kang, 1980), con modificaciones para adecuar la técnica a nuestras condiciones de estudio.

**Cuadro 2. Composición química de la urea común, ureas de lenta liberación y pasta de soya utilizadas en los experimentos *in vitro*.**

Composición química	Sustratos <sup>1</sup>			
	UC	PS	UPLL1	ULL2
Humedad (%)	0.01	9.5	2	1.8
Base seca <sup>2</sup> (%)				
Nitrógeno	44.7	8.3	40.1	38.6
Proteína cruda	279.4	52.0	250.7	241
Fibra cruda	---	3.89	---	---
Extracto Etéreo	---	1.47	9.46	14.31
Extracto libre de nitrógeno	---	35.1	---	---
Cenizas	---	7.55	1.35	---
Calcio	---	---	---	0.09

<sup>1</sup>Urea común (UC), pasta de soya (PS) y ureas de lenta liberación (UPLL1 y UPLL2).

Muestras de pasta de soya, urea común y ureas de lenta liberación fueron incubadas por duplicado en frascos de cristal color ámbar de 100 ml sellados herméticamente y colocados en un baño de agua con agitación mecánica a 39°C, en una concentración de 20 mg de MS por ml de líquido ruminal durante 0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 8, 12 y 24 h. Inmediatamente después de la incubación, un ml de ácido metafosfórico al 25% fue mezclado con 4 ml de líquido ruminal filtrado. El líquido ruminal fue almacenado a -20°C hasta el momento de la lectura.

Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g durante 20 min. El sobrenadante fue utilizado para determinar la concentración de amoníaco, usando 40 µl de líquido ruminal, los cuales fueron adicionados a tubos de ensayo previamente marcados. Posteriormente se añadió 2.5 ml de reactivo de fenol-nitroprusiato de sodio y 2.0 ml de reactivo de hipoclorito alcalino en cada tubo (Broderick y Kang, 1980) para la formación de indofenol, cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración de NH<sub>3</sub>-N de la muestra (Berthelot, 1859). Los tratamientos fueron analizados por triplicado. De cada tubo fueron obtenidos 300 µl y se colocarán en una placa de microtitulación con 96 pocillos para medir la absorbancia a una longitud de onda de 630 nm.

#### *Análisis químico de muestras y alimento*

Las muestras de pasta de soya, urea y productos comerciales de urea de lenta liberación fueron analizadas para determinar la humedad mediante el método 925.45 (Procedimiento 1960). La proteína cruda (CP) fue determinada utilizando el método Kjeldahl 920.176 (AOAC, 1997) y la proteína cruda se calculó como N x 6.25. Las muestras fueron secadas en una estufa de aire forzado a 55°C y molidas a través de una malla de 1 mm en un molino Wiley® (Thomas Wiley

Model 4; ThomasScientific, Swedesboro, NJ, EE. UU.). El contenido de materia seca (MS) fue determinada a 105°C (AOAC, 1997). El contenido de ceniza se determinó después de la combustión de la muestra en una mufla a 550°C durante 3 horas. El extracto etéreo (EE) se determinó usando el método Soxhlet (AOAC, 1997). El contenido de fibra detergente neutro libre de ceniza (FDNmo) se determinó según el método de Udén *et al.* (2005). El contenido de carbohidratos no-fibrosos (NFC) de la dieta se estimó con la siguiente fórmula:  $NFC (\%) = MS - (PC + EE + Cenizas + FDNmo)$ .

Las concentraciones de minerales se determinaron utilizando un Espectrómetro de Emisión Óptica (ICP-OES; Óptima 2000DV; Perkin Elmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Los minerales analizados en las muestras fueron calcio, fósforo, zinc y cobre.

#### *Cálculos y Análisis estadístico*

La degradabilidad *in vitro* (Experimento 1) de las muestras fue determinada con la siguiente fórmula:

$$\% DMS = 100 - [P_3 - (P_1 \times B_1)] / (P_2 \times MS) \times 100$$

Dónde:

DMS = % de degradabilidad de la materia seca

P<sub>1</sub> = Peso de la bolsita

P<sub>2</sub> = Peso de la muestra

P<sub>3</sub> = Peso final de la bolsita + muestra posterior a la degradabilidad *in vitro*

B<sub>1</sub> = Peso de la bolsita blanco (peso final/peso inicial)

Para la determinación de amoníaco *in vitro* (Experimento 2), la curva estándar fue calculada usando una regresión lineal, sustituyendo las absorbancias de la muestra (x) en la ecuación. Para corregir la dilución con ácido metafosfórico, el resultado fue multiplicando por 1.25, para lo cual se utilizó la siguiente ecuación;

$$y = mx + b (z)$$

Dónde:

y = concentración NH<sub>3</sub>-N

m = pendiente de la recta

x = absorbancia

b = intercepción de la recta

z = corrección de dilución

El diseño experimental para los dos experimentos fue completamente al azar, analizado mediante un modelo lineal univariado para ver las diferencias entre sustratos, y como medidas repetidas en el tiempo, para observar las diferencias intra-sustratos (Experimento 2), dónde la variable dependiente fue DIV (Experimento 1) y NH<sub>3</sub>-N (mg/dL) en líquido ruminal (Experimento 2). Las variables independientes fueron tiempo de incubación (h) y sustrato (pasta de soya, urea común, ULL1, ULL2) para ambos experimentos. La comparación de medias fue mediante la prueba Tukey a  $p \leq 0.05$ . Se determinaron los efectos inter-sustrato y se usó una prueba de contrastes ortogonales al encontrar la misma significancia para los efectos intra-sustrato (Experimento 2).



## RESULTADOS Y DISCUSIONES

En la Figura 1, se observa una pérdida de los sustratos ULL1 ( $p = 0.06$ ) y PS ( $p = 0.001$ ), por el tipo de lavado de las bolsitas de filtrado posterior a la incubación. Esta pérdida fue mayor con la inmersión de las bolsas en agua destilada a temperatura ambiente en comparación con el rociado con una piseta, debido a la solubilización de la urea cuando se sumerge en agua destilada a temperatura ambiente.

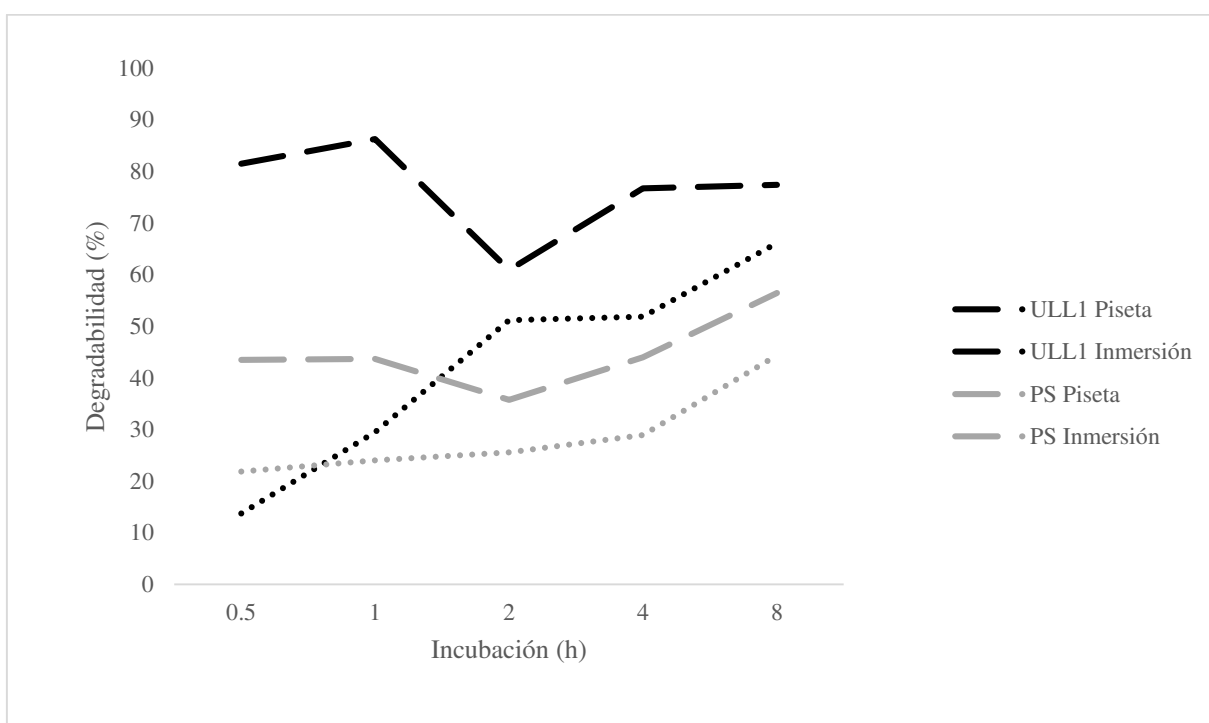


Figura 1. Influencia del tipo de lavado posterior a la incubación en DIV (%) de pasta de soya, urea común y productos comerciales de urea de lenta liberación (ULL; Optigen II®).

Los ensayos tradicionales *in situ* no pueden usarse para urea y otros compuestos solubles ya que los procedimientos de enjuague requeridos darían como resultado la solubilización de los residuos *in situ*, lo que llevaría a una sobreestimación de la desaparición ruminal (Holder,

2012). Algunos autores usaron un método gravimétrico con bolsas de nylon *in situ* para determinar la eficiencia de la liberación de la urea en el rumen (Taylor-Edwards *et al.*, 2009; Ceconi *et al.*, 2015;). Sin embargo, hay evidencia de la pérdida de sustrato en este tipo de métodos, lo que llevaría a resultados poco certeros de la estimación de la degradabilidad de la urea de lenta liberación en el rumen. Con un remojo de 15 min previo a la incubación, Marichal *et al.* (2009) observó la solubilización total del N de la urea común y un 50% en un producto de urea de lenta liberación. Además, los autores utilizaron dos tipos de lavado posterior a la incubación *in situ*, mecánico y manual, con una desaparición de la muestra (MS) de 60.6 y 31.6%, respectivamente. Estos problemas con el lavado de las bolsitas que se ha observado en estudios anteriores *in situ*, también se han observado en el presente estudio *in vitro* con tiempos de incubación similares. Sin embargo, los residuos de contenido ruminal son menores dado que el líquido ruminal fue previamente filtrado y los tiempos de lavado manuales fueron menores. En el caso de la ULL1, el lavado manual por inmersión represento una pérdida de muestra 44.5% mayor con respecto al enjuague corto con una piseta. Por esta razón, se ha sugerido el análisis de urea en residuos de bolsas sin lavar (Holder, 2012).

La diferencia en DIV de los sustratos, así como sus cambios a través del tiempo fue diferente ( $P < 0.001$ ) para los 4 sustratos (PS, UC, ULL1 y ULL2), observándose para las ULL una degradabilidad intermedia entre la UC y PS. Además se obtuvo una interacción tiempo por tratamiento ( $P < 0.001$ ) (Figura 2). Mientras que la UC se degrado completamente durante los primeros minutos, la degradación de la ULL1 y la ULL2 fue más lenta ( $P < 0.001$ ).

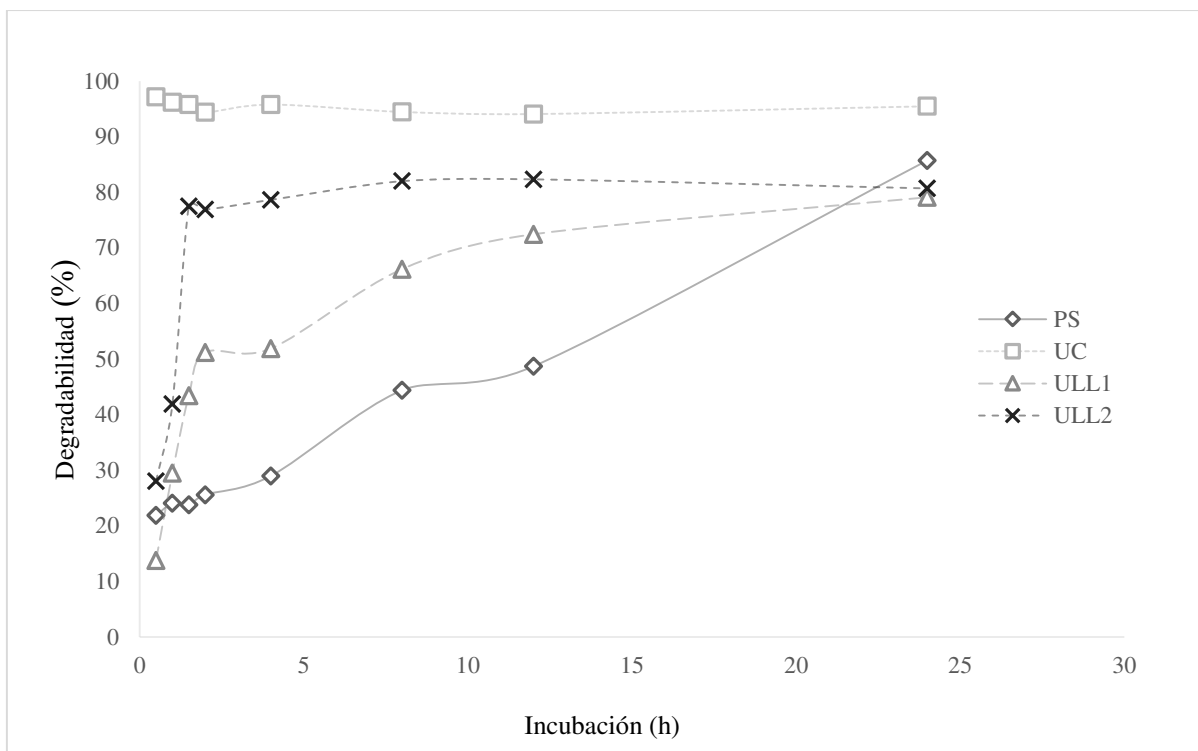


Figura 2. Degradabilidad *in vitro* a distintos tiempos de incubación de los sustratos (ULL1, Optigen II<sup>®</sup>; ULL2, Rumate<sup>®</sup>; UC, urea común; PS, pasta de soja) enjuagados con una piseta después de la incubación.

En la Figura 2, se presenta la DIV de los sustratos evaluados en este estudio. Mientras la urea se degradó inmediatamente durante los primeros 30 min, la pasta de soja se degradó cuadráticamente ( $P < 0.001$ ). Aunque la tasa de degradación de la PS fue menor a la UPLL1 ( $P < 0.001$ ), la degradabilidad total fue similar a la de la PS a las 24 horas. Akay *et al.* (2004) reportaron que el comportamiento los productos de ULL que ellos utilizaron fue muy similar a la PS *in situ*, resultado con el cual diferimos, ya que, en nuestro experimento, ambos productos de ULL tuvieron un comportamiento intermedio entre UC y PS.

En un estudio *in situ* con la misma fuente de urea de lenta liberación (ULL1; Optigen II<sup>®</sup>) utilizada en el presente estudio, Holder (2012) reportó un patrón de degradación de

aproximadamente 80% a las 20 h con varios lotes del mismo producto. Es importante resaltar que las condiciones de alimentación del animal fistulado fue similar al del presente estudio, con dietas altas en concentrado, consecuentemente, las poblaciones microbianas en el líquido ruminal deberían ser similares en ambos estudios. La DIV alcanzó un máximo de aproximadamente 80% a las 20 h de incubación ruminal, lo que indica que a las 20 h de incubación, el 20% de la urea aún no estaba disponible en el rumen, para el metabolismo ruminal (Holder, 2012). Además, la incubación simultánea *in situ* de bolsas de varios productos que contengan fuentes de urea de lenta liberación o para muchos tiempos de incubación podría suministrar una cantidad excesiva de urea al rumen con riesgo de efectos tóxicos para el animal (Spanghero *et al.*, 2018).

**Cuadro 3. Correlación entre degradabilidad y producción de NH<sub>3</sub>-N de cada sustrato a través del tiempo.**

Sustrato <sup>1</sup>	Correlación		
	DIV* NH <sub>3</sub> -N	Tiempo incubación *DIV	Tiempo incubación *NH <sub>3</sub> - N
PS	0.858 (P < 0.0001)	0.993 (P < 0.0001)	0.899 (P < 0.0001)
UC	-0.681(P < 0.0001)	-0.296 ( P = 0.160)	0.336 (P = 0.109)
ULL1	0.860 (P < 0.0001)	0.788 (P < 0.0001)	0.699 (P < 0.0001)
ULL2	0.878 (P < 0.0001)	0.488 (P = 0.016)	0.646(P < 0.0001)

<sup>1</sup>Sustratos: distintas fuentes de proteína verdadera y fuentes de NNP.

<sup>2</sup>P ≤ 0.05, correlación entre (%) Degradabilidad *in vitro* (DIV) y producción de NH<sub>3</sub>-N (mg/dL).

Se obtuvieron correlaciones positivas entre la DIV y la producción NH<sub>3</sub>-N para PS, ULLI y ULL2 (Tabla 3). En contraste, la correlación entre la DIV y la síntesis de NH<sub>3</sub>-N fue negativa (-0.681; P < 0.001) para la urea común debido a la rápida hidrólisis y liberación de amoníaco, que sucedió los primeros 30 minutos de incubación. Al igual que con la

degradabilidad, la producción de  $\text{NH}_3\text{-N}$  *in vitro* fue diferente ( $P < 0.001$ ) para los cuatro sustratos, siendo el comportamiento de las ureas de lenta liberación intermedio a de la PS y la UC, siendo más lenta la liberación de  $\text{N-NH}_3$  para la ULL1 que para la ULL2 (Figura 3).

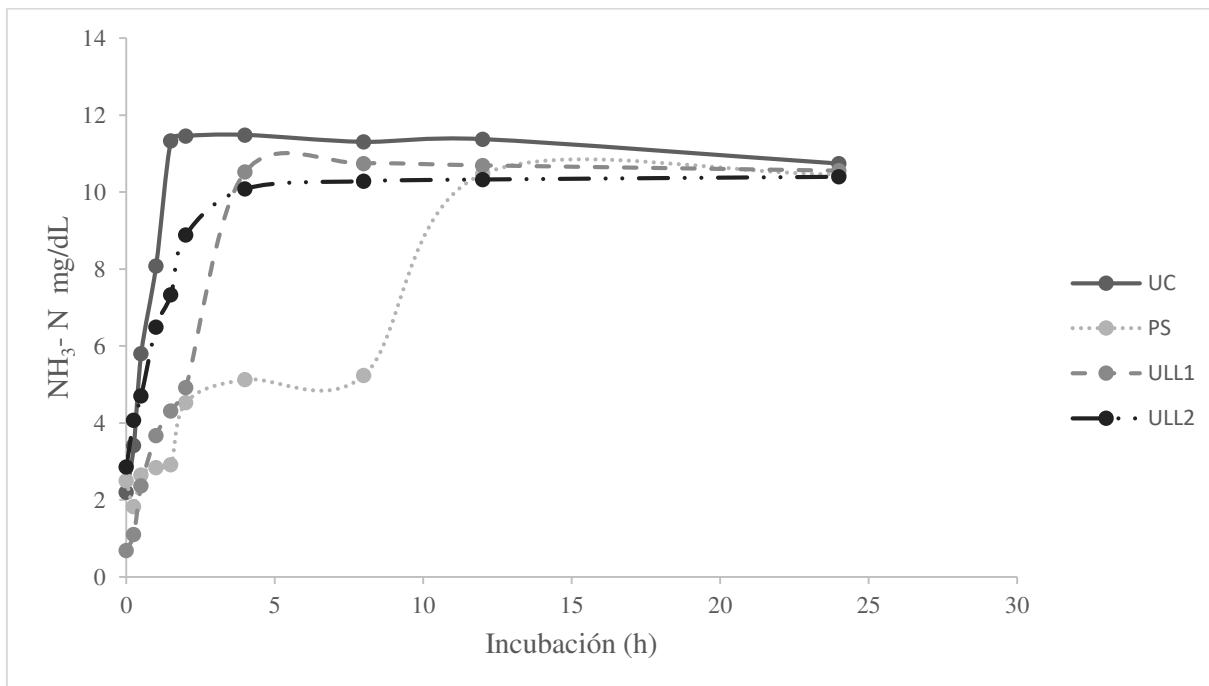


Figura 3. Producción de  $\text{N-NH}_3$  *in vitro* de los sustratos (ULL1, Optigen II<sup>®</sup>; ULL2, Rumate<sup>®</sup>; UC, urea común; PS, pasta de soya), a diferentes tiempos de incubación.

La máxima concentración de  $\text{NH}_3\text{-N}$  obtenida de la incubación de urea común fue de 11.5 mg/dl a los 1.5 h, manteniéndose en el rango de 10.7 a 11.5 mg/dl hasta las 24 h. A este mismo tiempo de incubación (1.5 h), las concentraciones de  $\text{N-NH}_3$  encontradas para ULL1 y ULL2 fueron 4.32 y 7.33 mg/dl, respectivamente. A las 4 h de incubación, las concentraciones de  $\text{N-NH}_3$  fueron de 10.5 y 10.1 para ULL1 y ULL2, respectivamente. En este estudio no se incluyó una fuente de almidón, lo que hubiera incrementado la utilización del  $\text{NH}_3\text{-N}$  al ser utilizado más rápidamente por los microorganismos ruminales (Holder, 2012).

Los valores máximos encontrados en el presente estudio fueron entre 4 y 8 h con 10.7 y 10.3 mg/dL para ULL1 y ULL2, respectivamente. Estos valores se encuentran dentro del rango establecido en estudios *in vivo* anteriores (9.5 a 15.8 NH<sub>3</sub>-N mg/dL) como requerimientos adecuado para los microorganismos ruminales (Allen y Miller, 1976). Lo anterior coincide con la liberación de NH<sub>3</sub>-N de otras fuentes de NNP (nitratos) de lenta liberación incubadas en liquido ruminal con buffer nutritivo (Lee *et al.*, 2017). Un comportamiento similar se observado *in vivo* (Lee *et al.*, 2015). En ambos casos las fuentes de NNP con algún recubrimiento redujeron la tasa de liberación de NH<sub>3</sub>-N, lo cual sugiere que los rangos de liberación de NH<sub>3</sub>-N del tiempo de incubación de 0 a 4 h podrían tener un efecto positivo en la producción de proteína microbiana.

Durante las primeras horas de incubación, se observa la mayor diferencia entre las 2 fuentes de ULL comerciales que se probaron en este experimento, siendo mayor la liberación de NH<sub>3</sub>-N de la ULL2 en las primeras 2 h de incubación. A las cuatro horas, las dos fuentes de ULL comerciales llegan a su pico de liberación de NH<sub>3</sub>-N (Figura 4).

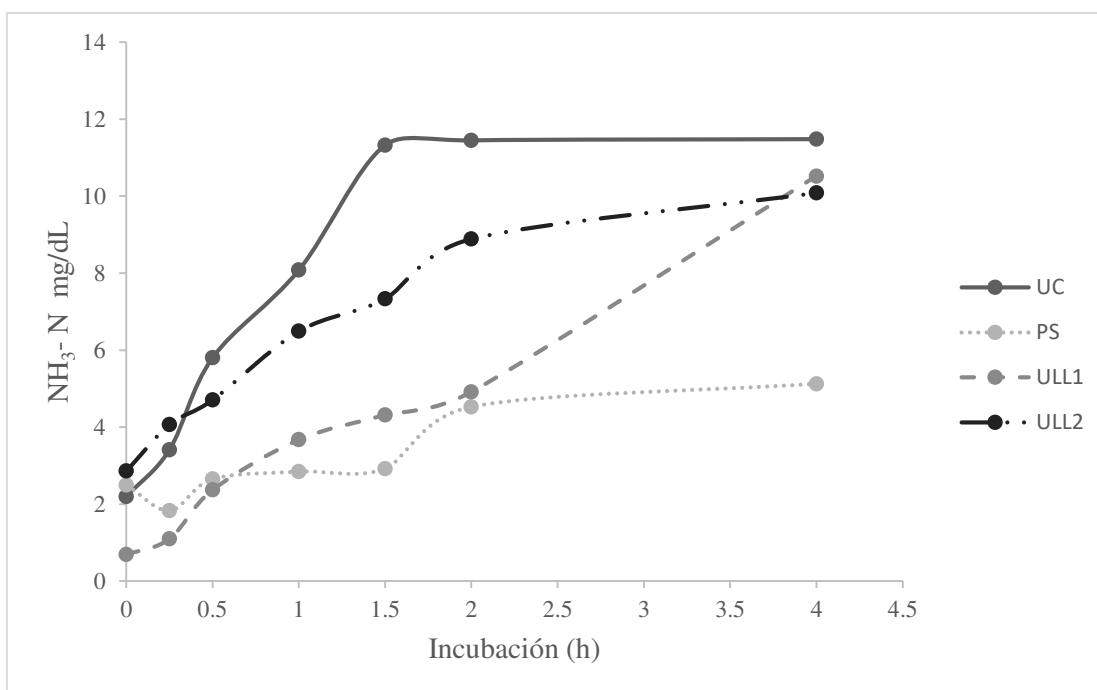


Figura 4. Liberación de NH<sub>3</sub>-N de los distintos sustratos durante las primeras horas de incubación *in vitro*.

Benedeti *et al.* (2014) reportó diferencias mínimas de la concentración de NH<sub>3</sub>-N en líquido ruminal de novillos cuando reemplazaron la harina de soya por urea de lenta liberación en una dieta con alto contenido de concentrado. En animales alimentados con urea de liberación lenta se muestra una menor concentración de amoníaco en el fluido ruminal, en comparación con los alimentados con urea, lo que sugiere una reducción del hidrólisis ruminal de la urea o una mayor utilización de NH<sub>3</sub>-N por microorganismos del rumen (Gardinal *et al.*, 2017). Es bien sabido que la urea es más tóxica cuando se alimenta a animales que consumen dietas altas en forraje que las dietas altas en concentrado. Generalmente, la disminución de la toxicidad se debe a la capacidad de la población microbiana para utilizar el NH<sub>3</sub>-N disponible, y porque un menor pH del rumen reduce la permeabilidad epitelial ruminal al NH<sub>3</sub>-N. Por lo tanto, la disminución de la tasa de degradación ruminal puede desempeñar un papel en la reducción de la toxicidad de la urea en las dietas altas en concentrados (Holder, 2012).

Es posible que las poblaciones microbianas que prevalecen en las dietas con mucho forraje puedan tener una producción de ureasa más alta que las poblaciones prevalecientes en las dietas con mucho concentrado (Holder, 2012). El pH afecta la actividad de la ureasa, teniendo mayor actividad a pH de entre 6.8 y 8.5, y eliminando por completo su actividad a un pH inferior a 3 (Mahadevan *et al.*, 1977; Muck, 1982).

En el Cuadro 4, se presentan las diferencias en producción de NH<sub>3</sub>-N intra-sustrato a través del tiempo. Mientras que en las primeras 1.5 h de incubación *in vitro*, la hidrólisis de UC generó una concentración máxima de NH<sub>3</sub>-N, las máximas concentraciones se obtuvieron a las 4 h para ULL1 y ULL2. La liberación de NH<sub>3</sub>-N de la ULL2 fue similar a la de la pasta de soya, mientras que la concentración de NH<sub>3</sub>-N de la ULL1 fue más lenta (P < 0.001).

**Cuadro 4. Diferencias en producción de NH<sub>3</sub>-N intra-sustrato a través del tiempo.**

	Sustratos <sup>1</sup> (NH <sub>3</sub> -N mg/dL)			
	PS	UC	ULL1	ULL2
<b>Incubación (h)</b>				
0	2.50 <sup>a</sup>	2.20 <sup>a</sup>	0.69 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>
0.25	1.83 <sup>b</sup>	3.41 <sup>b</sup>	1.10 <sup>b</sup>	4.07 <sup>b</sup>
0.5	2.65 <sup>c</sup>	5.80 <sup>c</sup>	2.37 <sup>c</sup>	4.71 <sup>c</sup>
1	2.84 <sup>d</sup>	8.08 <sup>d</sup>	3.67 <sup>d</sup>	6.49 <sup>d</sup>
1.5	2.92 <sup>d</sup>	11.33 <sup>f</sup>	4.32 <sup>e</sup>	7.33 <sup>e</sup>
2	4.53 <sup>e</sup>	11.45 <sup>g<sup>h</sup></sup>	4.92 <sup>f</sup>	8.89 <sup>f</sup>
4	5.13 <sup>f</sup>	11.48 <sup>h</sup>	10.52 <sup>g</sup>	10.08 <sup>g</sup>
8	5.24 <sup>f</sup>	11.30 <sup>f</sup>	10.74 <sup>h</sup>	10.29 <sup>g<sup>h</sup></sup>
12	10.47 <sup>e</sup>	11.37 <sup>fg</sup>	10.69 <sup>g<sup>h</sup>i</sup>	10.33 <sup>g<sup>h</sup>i</sup>
24	10.46 <sup>e</sup>	10.74 <sup>e</sup>	10.55 <sup>g<sup>i</sup></sup>	10.40 <sup>i</sup>
<b>EEM<sup>2</sup></b>	0.021	0.013	0.051	0.079
<b>Valor P<sup>3</sup></b>				
Lineal	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
Cuadrático <sup>2</sup>	0.0001	0.0001	0.061	0.0001
Cubico <sup>3</sup>	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001

<sup>1</sup>Sustratos: distintas fuentes de NNP y proteína verdadera;

<sup>2</sup>EEM, error estándar de la media.

<sup>3</sup>P ≤ 0.05, contrastes ortogonales entre tiempos de incubación de cada sustrato.

Se sabe que el pH afecta la actividad lipolítica ruminal, la cual se reduce significativamente a un pH inferior a 6 (Van Soest y Demeyer, 1996). Por lo tanto, la degradación enzimática del recubrimiento lipídico de los gránulos de Optigen®II, parece ser el mecanismo propuesto por Holder (2012), por el cual NH<sub>3</sub>-N se libera más lentamente. Al alimentar animales con una dieta alta en concentrado, se puede reducir la lipólisis ruminal y conducir a una liberación más lenta de la urea de los gránulos de Optigen®II (Holder, 2012).



Existen algunos estudios en los que se ha utilizado la producción de gas para evaluar algunos sustratos con urea (Cherdthong *et al.*, 2011; Cherdthong y Wanapat, 2014). Recientemente, Spanghero *et al.* (2018) estandarizaron una técnica de medición del gas producido para medir la degradación en el rumen de los productos de ULL, sugiriendo que la prueba de gas se puede usar para evaluar y clasificar las ULL comerciales en términos de la liberación estimada de  $\text{NH}_3\text{-N}$  en el rumen, y a partir de los productos de la fermentación de los sustratos como los AGV (ácidos grasos volátiles). Con la concertación de AGV solo se observan diferencias en los tiempos de incubación y no se ve afectada por la fuente de N. Las dietas que contienen fuentes de urea de lenta liberación tienen una mayor cantidad de ácido propionico en comparación con la urea común, lo anterior sugiere que el aumento de ácido propionico en el rumen está relacionado con la velocidad de liberación de la urea y una mayor utilización del nitrógeno (Gardinal *et al.*, 2017). Una mayor sincronización de carbohidratos fermentables y N en el rumen, aumenta las concentraciones de ácido propionico en el rumen (Alvarez-Almora *et al.*, 2012).

Sin embargo, en cualquier estudio *in vitro*, ya sea por métodos gravimétricos, por producción de gases o por foto-espectrometría, hay una desventaja de que algunas variables como la tasa de pasaje, producción de saliva, densidad de la materia orgánica en el rumen, además cualquier cosa que pueda afectar la solubilidad de la urea en el rumen, como el pH, pueden resultar en diferencia en la concentración de  $\text{NH}_3\text{-N}$  *in vitro* (Holder, 2012).

## CONCLUSIONES

La urea es una fuente de nitrógeno no-proteico usada en los alimentos para rumiantes que se solubiliza e hidroliza inmediatamente al entrar al rumen. Recubriendo la urea con una capa lipídica o un polímero, parece reducir su degradabilidad y permite una mejor sincronización del amoníaco liberado con la energía disponible generada en la fermentación ruminal de los carbohidratos. Aunque ambas ureas comerciales de lenta liberación parecen tener un recubrimiento lipídico, considerando su degradabilidad *in vitro*, la que más se asemeja a la pasta de soya fue el Rimate. Los valores máximos de amoníaco encontrados en el presente estudio ocurrieron entre 4 y 8 horas, con concentraciones que variaron entre 10 y 11 mg/dL, valores que se encuentran dentro del rango reportado por estudios *in vivo* anteriores de 9.5 a 15.8 NH<sub>3</sub>-N mg/dL, como concentraciones adecuadas para maximizar la síntesis de proteína microbiana en el rumen. Un hallazgo importante obtenido en este estudio es las altas correlaciones positivas y altamente significativas entre degradabilidad *in vitro* y la producción de amoníaco para la pasta de soya y las ureas de lenta liberación, pero no para la urea común.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Abdoun, K., F. Stumpff, H. Martens. 2006. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim. Health Res. Rev.* 7:43–59.
- Abdoun, K., F. Stumpff, I. Rabbani, H. Martens. 2010. Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO<sub>2</sub>. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298:190–202.
- Akay, V., J. Tikofsky, C. Holtz, K.A. Dawson. 2004. Optigen(r) 1200: controlled release of non-protein nitrogen in the rumen. In: *Nutritional Biotechnology in the feed and food industries, Alltech's Twenty First Annual Symposium: Proceedings: Nottingham.* Nottingham University Press. Pp. 79-185.
- Allen, S.A., E.L. Miller. 1976. Determination of nitrogen requirement for microbial-growth from effect of urea supplementation of a low N diet on abomasal N flow and N recycling in wethers and lambs. *Br. J. Nutr.* 36:353–368.
- Allison, M. J. 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *J. Anim. Sci.* 29:797–807.
- Alvarez-Almora, E.G., G.B. Huntington, J.C. Burns. 2012. Effects of supplemental urea sources and feeding frequency on ruminal fermentation, fiber digestion, and nitrogen balance in beef steers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 171:136-45.
- AOAC. 1997. *Official Methods of Analysis*, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., USA.

- Appleby, C. 1955. The isolation and classification of proteolytic bacteria from the rumen of the sheep. *J. Gen. Microbiol.* 12:526–533.
- Augustin, M., Y. Hemar. 2009. Nano-and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chem. Soc. Rev.* 38: 902-912.
- Benedeti, P.D.B., P.V.R. Paulino, M.I. Marcondes, S.C. Valadares-Filho, T.S. Martins, E.F. Lisboa, L.H.P. Silva, C.R.V. Teixeira y M.S. Duarte. 2014. Soybean meal replaced by slow release urea in finishing diets for beef cattle. *Livest. Sci.* 165:51-60.
- Berthelot, M.P.E. 1859. Violet D'aniline. *Repert Chim Appl.* 1:284
- Bourg, B.M., L.O. Tedeschi, T.A. Wickersham, and J.M. Tricarico. 2012. Effects of a slow-release urea product on performance, carcass characteristics, and nitrogen balance of steers fed steam-flaked corn. *J. Anim. Sci.* 90:3914–3923.
- Broderick, G.A., J.H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *J. Dairy Sci.* 63:64
- Broderick, G.A., M.J. Stevenson, and R.A. Patton. 2009. Effect of dietary protein concentration and degradability on response to rumen-protected methionine in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:2719-2728.
- Ceconi, I., M. J. Ruiz-Moreno, N. Dilorenzo, A. Dicostanzo, and G.I. Crawford. 2015. Effect of slow-release urea inclusion in diets containing modified corn distillers grains on total tract digestibility and ruminal fermentation in feedlot cattle. *J. Animal Sci.* 93:4058–4069.

- Cherdthong, A., M. Wanapat, C. Wachirapakorn. 2011. Influence of urea-calcium mixtures as rumen slow-release feed on in vitro fermentation using a gas production technique. *Arch. Anim. Nutr.* 65:242–254.
- Cherdthong, A., M. Wanapat. 2014. In vitro gas production in rumen fluid of buffalo as affected by urea-calcium mixture in high-quality feed block. *Anim. Sci. J.* 85:420-426.
- Cook, A. R. 1976. The elimination of urease activity in *Streptococcus faecium* as evidence for plasmid coded urease. *J. Gen. Microbiol.* 9:49-58.
- Czerkawski, J.W., W. Breckenridge. 1982. Distribution and changes in urease activity in rumen simulation technique. *Br. J. Nutr.* 47:331–348.
- Deyoe, C., E. Bartley, H. Pfoest, F. Boren, H. Perry, F. Anstaett, L. Helmer, D. Stiles, A. Sung, and R. Meyer. 1968. An improved urea product for ruminants. *J. Anim. Sci.* 27:1163.
- Galo, E., S.M. Emanuele, C.J. Sniffen, J.H. White, and J.R. Knapp. 2003. Effects of a polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 86:2154-2162.
- Gardinal, R., G.D. Calomeni, N.R.B. Cônsolo, C.S. Takiya, J.E. Freitas Jr, J.R. Gandra, T.H. A. Vendramini, H.N. Souza, F.P. Rennó. 2017. Influence of polymer-coated slow-release urea on total tract apparent digestibility, ruminal fermentation and performance of Nellore steers. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 1:34-41
- Harrison, G.A., T.P. Karnezos. 2005. Can we improve the efficiency of nitrogen utilization in the lactating dairy cow? *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 15:143-154.

- Holder, V.B. 2012. The Effects of Slow Release Urea on Nitrogen Metabolism in Cattle. Doctoral Theses, Animal and Food Sciences, University of Kentucky, USA.
- Hume, I.D., R. J. Moir, M. Somers. 1970. Synthesis of microbial protein in rumen. 1. Influence of level of nitrogen intake. *Aust. J. Agric. Res.* 21: 283-296.
- Huntington, G. B., S. L. Archibeque. 2000. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *J. Anim. Sci.* 78:742-749.
- Huntington, G., D. Harmon, N. Kristensen, K. Hanson, J. Spears. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Anim. Feed Sci. Technol.* 130: 225-241.
- Kiran, D., T. Mutsvangwa. 2007. Effect of barley grain processing and dietary ruminally degradable protein on urea nitrogen recycling and nitrogen metabolism in growing lambs. *J. Anim. Sci.* 85:3391-3399.
- Lapierre, H., G.E. Lobley. 2001. Nitrogen recycling in the ruminant: a review. *J. Dairy Sci.* 84:223-236.
- Lee, C., R.C. Araujo, K.M. Koenig, K.A. Beauchemin. 2017. In situ and in vitro evaluations of a slow release form of nitrate for ruminants: Nitrate release rate, rumen nitrate metabolism and the production of methane, hydrogen, and nitrous oxide. *Anim. Feed Sci. Technol.* 231:97-106.
- Lee, C., R.C. Araujo, K.M. Koenig, K.A. Beauchemin. 2015. Effects of encapsulated nitrate on enteric methane production and nitrogen and energy utilization in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 93:2391-2404

- Lewis, D. 1960. Ammonia toxicity in the ruminant. *J. Agric. Sci.* 55:111–117.
- Li, M., J. Rushing, E. Robison. 1996. Stability of B-complex vitamins in extruded catfish feeds. *J. Appl. Aquaculture* 6:67-71.
- López-Soto, M.A., C.R. Rivera-Méndez, J.A. Aguilar-Hernández, A. Barreras, J F. Calderón-Cortés, A. Plascencia, H. Dávila-Ramos, A. Estrada-Angulo, Y.S. Valdes-García. 2014. Effects of combining feed grade urea and a slow-release urea product on characteristics of digestion, microbial protein synthesis and digestible energy in steers fed diets with different starch:ADF ratios. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* 27:187-193
- Ludden, P.A., D.L. Harmon, B.T. Larson, D.E. Axe. 2000. Influence of the novel urease inhibitor N-(n-butyl) thiophosphoric triamide on ruminant nitrogen metabolism: I. In vitro urea kinetics and substrate digestion. *J. Anim. Sci.* 78:181-187.
- Mahadevan, S., F.D. Sauer, J.D. Erfle. 1977. Purification and properties of urease from bovine rumen. *Biochemical J.* 163:495.
- Males, J.R., R.A. Munsinger, R.R. Johnson. 1979. In vitro and in vivo ammonia release from “slow-release” urea supplements. *J. Anim. Sci.* 48:887-892.
- Marchetti, M., N. Tossani, S. Marchetti. 1995. Vitamin degradation in premix as a function of the kind of trace-mineral present. *Zoot. Nutr. Anim.* 21:67-73.
- Marichal, M.J., A.I. Trujillo, M.H. Guerra, M. Carriquiury, L. Piaggio. 2009. Comparación de las cinéticas de liberación de N-NH<sub>3</sub> in vitro y de la degradación ruminal del N de la urea protegida, urea y subproductos agroindustriales. *Agrociencia Uruguay.* 15:52–59.

- Marín, M., y L. Andrés. 2009. Urea de lenta degradación ruminal como sustituto de proteína vegetal en dietas para rumiantes - Slow release urea as substitute for plant protein in diets for ruminants, 10:1-14.
- Marini, J.C., M.E. Van Amburgh. 2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 81:545-552.
- Mascardi, L.E. 2007. Evaluación de una fuente de urea protegida en la dieta de terneros alimentados a corral. Tesis Doctoral. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- McDonald, I.W. 1958. The utilization of ammonia- nitrogen by the sheep. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 2:46-51.
- Muck, R.E. 1982. Urease activity in bovine feces. *Journal of dairy science* 65: 2157-2163.
- Oltjen, R.R. 1969. Effects of feeding ruminants non- protein nitrogen as the only nitrogen source. *J. Anim. Sci.* 28:673-681.
- Oltjen, R.R., L.L. Slyter, A.S. Kozak, E.E. Williams Jr. 1968. Evaluation of urea, biuret, urea phosphate and uric acid as NPN sources for cattle. *J. Nutr.* 94:193-202.
- Owens, F.N., W.G. Bergen. 1983. Nitrogen metabolism of ruminant animals: historical perspective, current understanding and future implications. *J. Anim. Sci.* 57:498-518.
- Owens, F. N., K. S. Lusby, K. Mizwicki, O. Forero. 1980. Slow ammonia release from urea: rumen and metabolism studies. *J. Anim. Sci.* 50:527-531.
- Parker, D.S., M.A. Lomax, C.J. Seal, J.C. Wilton. 1995. Metabolic implications of ammonia production in the ruminant. *Proc. Nutr. Soc.* 54:549-563.



- Patra, A.K., and J. Saxena. 2009. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. *Nutr. Res. Rev.* 22:204-219.
- Patra, A.K., Z. Yu. 2014. Effects of vanillin, quillaja saponin, and essential oils on *in vitro* fermentation and protein-degrading microorganisms of the rumen. *Appl Microbiol Biotechnol* 98:897-905.
- Puniya, A.K., R. Singh, D.N. Kamra. 2015. *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution*. Springer India 329-341.
- Rekib, A., D.P. Sadhu. 1986. Effect of feeding higher doses of urea on the rumen metabolism in goat. *Indian Vet. J.* 45:735-739
- Reynolds, C.K., N.B. Kristensen. 2008. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. *J. Anim. Sci.* 86:293-305.
- Reynolds, C.K., G.B. Huntington. 1988. Partition of portal drained visceral net flux in beef steers. 1. Blood flow and net flux of oxygen, glucose and nitrogenous compounds across stomach and post-stomach tissues. *Br. J. Nutr.* 60:539-551
- Russell, J.B. 1998. Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.* 76:1955-1963.
- Rybosová, E., P. Javorský, I. Havassy, K. Horský. 1984. Urease activity of adherent bacteria in the sheep rumen. *Physiol. Bohemoslov* 33:411-416.

- Sacadura, F., P. Robinson, E. Evans, M. Lordelo. 2008. Effects of a ruminally protected B-vitamin supplement on milk yield and composition of lactating dairy cows. *Anim. Feed Sci. Technol.* 144:111-124.
- Satter, L.D., L.L. Slyter. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *Brit. J. Nutr.* 32:199-208.
- Smith, C. J., M. P. Bryant. 1979 Introduction to metabolic activities of intestinal bacteria. *Am J. Clin. Nutr.* 32:149-157.
- Spanghero M., A. Nikulina, F. Mason. 2018. Use of an in vitro gas production procedure to evaluate rumen slow-release urea products. *Anim. Feed Sci. Tech.* 237:19-26.
- Spears, J.W., E. E. Hatfield. 1979. Nickel for ruminants. I. Influence of dietary nickel on ruminal urease activity. *J Anim. Sci.* 47:1345–1350.
- Taniguchi, K., G.B. Huntington, B.P. Glenn. 1995. Net nutrient flux by visceral tissues of beef steers given abomasal and ruminal infusions of casein and starch. *J. Anim. Sci.* 73:236-249.
- Taylor, C.C., N.A. Elam, S.E. Kitts, K.R. McLeod, D.E. Axe, D.L. Harmon. 2005. Influence of slow release urea on N balance and nutrient absorption of steers. *J. Anim. Sci.* 83:1-58.
- Taylor-Edwards, C.C., G. Hibbard, S.E. Kitts, K.R. McLeod, D.E. Axe, E.S. Vanzant, N.B. Kristensen, and D.L. Harmon. 2009. Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers. *J. Anim. Sci.* 87:200-208.

- Udén, P., Robinson, P.H., Wiseman, J. 2005. Use of detergent system terminology and criteria for submission of manuscripts on new or revised, analytical methods as well as descriptive information on feed analysis and/or variability. *Anim. Feed Sci. Technol.* 118:181-186
- Valenzuela, C., V. Hernández, F. Rodríguez, R. Carrillo. 2013. Tecnología de Encapsulación y su Aplicación en Ciencias Veterinarias. *Avances en Ciencias Veterinarias* 28:58-75.
- Van Nevel, C., D. Demeyer. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod. Nutr. Dev.* 36: 53–63
- Van Soest, P.J., J.B. Roberston, B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- Van Wyk, L., P.L. Steyn. 1975. Ureolytic bacteria in sheep rumen. *J. Gen. Microbiol.* 91:225-232.
- Wallace, R.J., G.A. Broderick, M. L. Brammall. 1987. Microbial protein and peptide metabolism in rumen fluid from faunated and ciliate-free sheep. *Br. J. Nutr.* 58:87-93.
- Wang, C., M. Wang, S. Ye, W. Tao, Y. Du. 2011. Effects of copper-loaded chitosan nanoparticles on growth and immunity in broilers. *Poultry Sci.* 90:2223-2228.
- Whitelaw, F. G., J. S. Milne, S. A. Wright. 1991. Urease (EC 3.5.1.5) inhibition in the sheep rumen and its effect on urea and nitrogen metabolism. *Br. J. Nutr.* 66:209-225.
- Xin, H., D. Schaefer, Q. Liu, D. Axe, Q. Meng. 2010. Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating

performance of Holstein dairy cows fed a steamflaked corn-based diet. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23: 491-500.

Yuan, L., L. Geng, L. Ge, P. Yu, X. Duan, J. Chen, Y. Chang. 2013. Effect of iron liposomes on anemia of inflammation. *Int. J. Pharm.* 454:82-89.

Zuntz, N. 1891. Bemerkungen über die Verdauung und den Nährwerth der Cellulose. *Pflügers Archiv. European J. Physiology* 49:477-483.