

**UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO NO PROTEICO DE LIBERACIÓN CONTROLADA  
EN DIETAS A BASE DE ENSILAJE DE MAÍZ: ASPECTOS DIGESTIVOS Y  
METABÓLICOS**

***Ing. Agr. Verónica Vanina Jankovic***

Trabajo de Tesis para ser presentado como requisito parcial para optar al Título de  
***MAGISTER SCIENTIAE en PRODUCCION ANIMAL***

Orientación en Nutrición Animal  
Área de Producción y Sanidad Animal

PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS AGRARIAS  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE MAR DEL PLATA**

**Balcarce, Argentina**

**Mes y año** (que figuran en el acta de aprobación)

**UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO NO PROTEICO DE LIBERACIÓN CONTROLADA  
EN DIETAS A BASE DE ENSILAJE DE MAÍZ: ASPECTOS DIGESTIVOS Y  
METABÓLICOS**

***Ing. Agr. Verónica Vanina Jankovic***

.....  
Daniel H. Rearte, Ing. Agr..., M. Sc, Ph. D.  
Director de Tesis

.....  
Gustavo J. Depetris, Méd. Vet., M. Sc.  
Asesor

.....  
Ariela Cesa, Ing. Agr., M. Sc.  
Asesora



**UTILIZACIÓN DE NITRÓGENO NO PROTEICO DE LIBERACIÓN CONTROLADA  
EN DIETAS A BASE DE ENSILAJE DE MAÍZ: ASPECTOS DIGESTIVOS Y  
METABÓLICOS**

***Ing. Agr. Verónica Vanina Jankovic***

**Aprobada por:**

.....  
Santini, Francisco J., Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.  
Evaluador

.....  
Pordomingo, Anibal, Ing. Agr., M. Sc., Ph. D.  
Evaluador

.....  
Arroquy, Jose I. Dr. M. Sc., Ph. D.  
Evaluador

## DEDICATORIA

A mis amores:  
Lucas, Jerónimo, Berenice,  
Lautaro, Gustavo,  
Laureano, Octavio, mi familia y a quien está en camino!

## **AGRADECIMIENTOS**

A Daniel Rearte por su guía, respaldo incondicional y por confiar en mí.

A Ariela Cesa por su orientación, dedicación y entrega sin medidas.

A Gustavo Depetris por su dedicación.

A Francisco Santini, Anibal Pordomingo y José Arroquy por lo enriquecedor de sus aportes y por permitirme disfrutar a pleno la etapa de corrección de la tesis.

Al Grupo de Investigación de la EEA INTA Cuenca del Salado y por su intermedio a toda la experimental por su incondicionalidad y respaldo.

A Ivana Stefanasi, Cecilia Baeza, Eduardo Ochner, Marita Coccimano, Laura Maccor, Mario Salvador Aello, Pablo Ciccore; a los que estuvieron, a los que están y a los que seguirán a mi lado a pesar de todo. Gracias,

... porque no todo lo aprendido esta escrito aquí.

## INDICE

<b>INDICE DE CUADROS</b>	ix
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>RESUMEN</b>	xi
<b>ABSTRACT</b>	xiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS</b>	6
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	8
3.1. Lugar y periodo experimental	8
3.2. Tratamientos	8
3.3. Animales	8
3.4. Dieta suministrada	9
3.5. Cronograma del ensayo	9
3.6. Determinación de los parámetros ruminales y sanguíneos	10
3.6.1. Ambiente Ruminal	10
3.6.2. Digestibilidad aparente in vivo	10
3.6.3. Síntesis de proteína microbiana	12
3.6.4. Metabolitos sanguíneos	13
3.6.5. Comportamiento animal	13
3.7. Diseño experimental y análisis estadístico	14
<b>4. RESULTADOS</b>	17
4.1. Calidad del ensilaje de planta entera de maíz	17
4.2. Peso, Consumo de materia seca, Digestibilidad aparente in vivo, heces y comportamiento ingestivo.	17
4.3. Parámetros del ambiente ruminal	18

4.4.	Síntesis de proteína microbiana	21
4.5.	Metabolitos plasmáticos	22
<b>5.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>33</b>
<b>7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>34</b>



**INDICE DE CUADROS**

<b>Cuadro N°1</b> Caracterización de la composición nutricional de ensilajes de planta entera de maíz. ....	<b>17</b>
<b>Cuadro N°2</b> Parámetros ruminales en los animales del ensayo. T1: con NNP-LC en dosis única; T2: NNP-LC mezclado en la ración y T3 urea mezclada con la ración.....	<b>21</b>
<b>Cuadro N°3</b> Valores promedio de las variables utilizadas para calcular la síntesis de proteína microbiana (SPM) en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3) .....	<b>21</b>
<b>Cuadro N°4</b> Síntesis de proteína microbiana (SPM) y eficiencia de la síntesis en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3).....	<b>22</b>
<b>Cuadro N°5</b> Concentración de metabolitos plasmáticos en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).....	<b>22</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura N°1</b> Cronograma de actividades y horarios de muestreos durante la fase experimental.....	<b>10</b>
<b>Figura N°2</b> Caracterización del ambiente ruminal por la variable pH a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3). .....	<b>19</b>
<b>Figura N°3</b> Concentración de N-NH <sub>3</sub> ruminal (mg/dl) a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3).....	<b>20</b>
<b>Figura N°4</b> Amplitud entre valores máximos y mínimos de la concentración de N-NH <sub>3</sub> ruminal (mg/dl) a lo largo del día y horas por encima del valor umbral de concentración de N-NH <sub>3</sub> ruminal necesaria para eficientizar la síntesis de proteína microbiana, en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3) .....	<b>20</b>
<b>Figura N°5</b> : Concentración de glucosa en plasma (GL) a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).....	<b>23</b>
<b>Figura N°6</b> : Concentración de urea (Ur.) en plasma en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).....	<b>24</b>
<b>Figura N° 7</b> : Concentración de triglicéridos (TG) en plasma a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).....	<b>24</b>

## RESUMEN

Los ensilajes poseen un bajo contenido proteico y degradación lenta (40 a 50% en las primeras 20 h). Es aconsejable acompañarlos con una fuente de nitrógeno que permita sincronizar la fuente energética de la dieta y la oferta nitrogenada y generar un ambiente ruminal eficiente. Es práctica habitual utilizar urea como fuentes de nitrógeno no proteico (NNP). Su rápida liberación no permite una adecuada sincronización. La utilización de una fuente de NNP de liberación controlada ajustaría mejor la curva de liberación de nitrógeno y energía. Por tal motivo se evaluó el efecto de la suplementación de dietas a base de ensilaje de maíz, con una fuente de NNP de lenta liberación ruminal (NNP-LC) y la misma fuente NNP de rápida liberación (urea) y diferentes frecuencias de suministro, sobre las características del ambiente ruminal, parámetros sanguíneos y la síntesis de proteína microbiana. Se utilizaron 3 novillos Hereford x Angus de  $363,33 \pm 13,05$  de peso vivo (PV), provistos de cánulas en rumen y duodeno; bajo un diseño Cuadrado Latino  $3 \times 3$ . La ración estaba compuesta por 98,07% un de ensilaje y sales minerales, ofrecido a voluntad y 1,6 % dieta MS/d de la fuente de NNP. Los tratamientos fueron: T1: suministrar en una dosis la totalidad de NNP-LC; T2: suministro de la dosis (NNP-LC) disponible a lo largo del día con la ración y T3: idéntica situación que T2 pero con urea. Se caracterizó el ambiente ruminal mediante el pH, concentración AGV y  $N-NH_3$ ; y se evaluaron metabolitos plasmáticos: glucemia (GL), triacilgliceridemia (TG) y uremia. Además, se midió consumo (CMS), digestibilidad (*D in vivo* MS) de la dieta, síntesis de proteína microbiana (SPM) y se evaluó el comportamiento ingestivo (CI). La *D in vivo* MS, SPM, CI y el CMS se analizaron con el procedimiento GLM de SAS 9.1 y las variables restantes como medidas repetidas en el tiempo con el procedimiento "Proc mixed" de SAS 9.1. En la concentración de AGV totales ( $120,03 \pm 3,93$  mMol/L), en el pH ( $6,83 \pm 0,06$ ), el CMS Kg MS/d ( $10,02 \pm 0,37$ ), el CI Min totales consumiendo ( $307,22 \pm 17,7$ ), SPM g/d ( $160 \pm 3,37$ ); GL mg/dl ( $0,64 \pm 0,05$ ) y en la *D in vivo* MS % ( $69,7 \pm 0,98$ ), no hubo diferencias ( $p > 0,05$ ). Se detectó interacción tratamiento x hora (TxH) ( $p < 0,05$ ) para la variable  $N-NH_3$  en las horas 1 y 8. También (TxH  $p < 0,05$ ) para la uremia en la hora 4 y 8. Los tratamientos presentaron un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en la variable TG. Concluimos que NNP-LC incrementó la concentración de trigliceridemia, generó mayor estabilidad en los parámetros ruminales y sanguíneos. Todo ello estaría influido por la frecuencia de suministro, por lo que se requiere profundizar la investigación sobre la temática.

**Palabras clave:** sincronización, optimización de síntesis de proteína, nitrógeno no proteico de liberación controlada.

## SUMMARY

Silages have a low protein content and slow degradation rate (40 to 50% in the first 20 h. A source of nitrogen that synchronizes with the type of energy silage provide could generate a more efficient rumen environment. Urea is frequently used as a nitrogen source, but because of rapid hydrolyzation into ammonia the rate of nitrogen release matches poorly the rate of fiber degradation. Excess ruminal ammonia could enter the blood stream and causes ammonia intoxication. Using a slow-release nitrogen source (NNP-LC) would better match fermentation and nitrogen supply to rumen bacteria. Among nitrogen rich products is a source of nitrogen of a slow-release rate. The present study evaluated the effect of including NNP-LC or urea as nitrogen sources on corn silage based diet on blood serum profiles, ruminal fermentation and bacterial protein synthesis. Three Hereford x Angus steers ( $363,33 \pm 13,05$  kg) fitted with rumen and duodenal canulas were fed on a diet based 98,07% corn silage and mineral supplement and 1,6% of the nitrogen source. Animals were kept in individual stalls with free access to water. The diet was offered in excess to the daily intake to affect voluntary intake the least.. A 3 x 3 Latin square was used (3 treatments and 3 sampling periods) to generate the replicates. Treatments were: T1 = the level of NNP-LC in one full dose; T2 = the level of NNP-LC during the day with the diet., and T3 – idem T2 but using urea. Rumen pH, VFA and N-NH<sub>3</sub> concentrations, serum glucose, triglycerides, and blood urea were measured. Dry matter intake (DMI) and digestibility of the diet (DMD), microbial protein synthesis (MPS) and intake behavior (IB) were also determined. Variables DMD, MPS, IB and DMI were analysed using GLM procedures of SAS 9.1. The remaining variables using repeated measures of Proc Mixed models of SAS 9.1. No treatment effects ( $P > 0.05$ ) were detected for DMI, VFS, DMD, IB, serum glucose and MPS ( $10,02 \pm 0,37$  kg/d,  $120 \pm 3,93$  mMol/L,  $6,83 \pm 0,06$ ,  $69,7 \pm 0,98$  %,  $307,2 \pm 17,7$  minutes,  $0,64 \pm 0,05$  mg/dl and  $160 \pm 3,37$  g/d respectively). A significant interaction ( $P < 0.05$ ) treatment by sampling time for rumen N- NH<sub>3</sub> was detected for hours 1 and 8. A significant interaction was also detected ( $P < 0.05$ ) for rumen ammonia for hours 4 and 8. Significant treatment effects ( $P < 0.05$ ) were detected for TG. We concluded that NNP-LC increases concentration of blood triglycerides and yields lower peaks of rumen NH<sub>3</sub>-N and serum urea than urea. The form of supply greatly affects these responses; therefore, feeding strategies would require more detailed studies.

**Key words:** nitrogen and energy synchronization, optimizing protein synthesis, slow-release nitrogen source.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los rumiantes, dadas sus características fisiológicas y la simbiosis con los microorganismos ruminales, presentan ventajas competitivas en el uso de alimentos fibrosos respecto de los animales monogástricos. Los microorganismos ruminales tienen la capacidad, dependiendo de la tasa de degradación y tiempo de permanencia en el rumen, de degradar los compuestos nitrogenados y los carbohidratos, en metabolitos intermedios  $\text{NH}_3$ , aminoácidos y péptidos- que permiten la síntesis de compuestos de alto valor nutricional como lo es la proteína microbiana que aporta aminoácidos esenciales y ácidos grasos volátiles (Dewhurst et al. 2000). El  $\text{N-NH}_3$  que no es captado por los microorganismos ruminales pasa a la sangre y en el hígado es metabolizado a N-urea, el cual puede ser excretado por orina o reciclado al tracto gastrointestinal (TGI). La proteína microbiana que se produce en el rumen proporciona más de la mitad de los aminoácidos absorbidos por los rumiantes y puede constituir entre 70 y 100 % del nitrógeno (N) disponible en las partes bajas del tracto digestivo en animales que consumen dietas fibrosas con bajo contenido proteico (Ørskov 1992). El reciclado de urea puede ser del 30 al 77 % del nitrógeno dietario; la misma es hidrolizada a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y puede ser utilizada como fuente de N para la síntesis de proteína microbiana (Nolan y Dobos 2005; Bach, et al. 2005; Stern et al. 1994; Van Soest, 1994); también puede ser reabsorbido hacia el torrente sanguíneo reiniciando el ciclo o ser excretado en la materia fecal. El balance entre energía y proteína determina el destino de los péptidos liberados, pudiendo darse la inmovilización o la liberación. Si hay suficiente energía disponible, los microorganismos la utilizarán para la síntesis proteica. De lo contrario, la prioridad estará en las rutas catabólicas que produzcan ATP para cubrir las necesidades energéticas del resto de las funciones metabólicas del microorganismo (Ørskov 1992). Este proceso metabólico del nitrógeno no proteico (NNP), permite que los rumiantes hagan un uso eficiente de compuestos nitrogenados no aminoacídicos o incluso de urea liberada en sangre o saliva, resultando de gran importancia en dietas con baja concentración de N. En las primeras dos horas posteriores a una ingesta se producen los niveles más elevados de  $\text{N-NH}_3$  y de allí comienza a descender su concentración hasta el nuevo suministro (Preston; Leng 1990, Elizalde; Santini, 1992; Rearte, 1995; Obispo, 2005) esta dinámica genera situaciones de acople y desacople con la disponibilidad de energía. Existen otros factores que generan oscilaciones en los niveles de

nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) en el rumen como ser el momento de alimentación durante el día, el tipo de fuente nitrogenada y las formas de suministro de N. Para optimizar el crecimiento microbiano es necesario alcanzar concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en rumen de hasta 23,5 mg/dl, los cuales se alcanzan con dietas que contengan valores superiores al 9% PB o 1,2 grN/Kg materia orgánica degradable en rumen (Hoover, 1986; Clark et al., 1992; Bach et al., 2005a; Bach et al., 2005b). Si hablamos de la concentración de proteína bruta en la dieta a la cual se produce el máximo crecimiento microbiano, esta sería aproximadamente de 12-13 % (Satter y Roffler, 1975). Los factores más importantes que modulan la degradación microbiana de las proteínas de la dieta son el tipo de proteína, las interacciones con otros nutrientes, principalmente los compuestos energéticos y la población microbiana predominante, la cual depende del tipo de ración, la tasa de pasaje y el pH ruminal (Herrera-Saldana et al., 1990; Lorenzatti, et al. 2004; Bach et al. 2005,).

Entendiendo que los desbalances entre energía y proteína afectan la dinámica de la población de microorganismos ruminales, el ambiente ruminal, la disponibilidad de proteína de alto valor biológico, la concentración de ácidos grasos volátiles y en consecuencia los niveles de producción, resulta de gran importancia buscar estrategias que permitan entregar una dieta balanceada en C:N. Forma parte a nivel mundial del manejo nutricional de los sistemas ganaderos intensificados la entrega de ensilados, los cuales aseguran una adecuada concentración de hidratos de carbono solubles, fibra, niveles proteicos variables en función de la especie utilizada y una buena digestibilidad. En este contexto, la utilización de ensilajes de maíz y sorgo de planta entera ocupa un lugar destacado dentro de las alternativas forrajeras, siendo estos cultivos los más utilizados, dada su alta producción de materia seca, el elevado contenido de grano. Estas características permitirían asegurar, un buen aporte energético proveniente del almidón contenido en los granos, y en menor medida en hojas, chala, marlo y tallos asegurando el proceso fermentativo (Fisher; Burns, 1987). Los carbohidratos estructurales (hemicelulosa, celulosa, pectinas) de los tallos y hojas, en especial al fermentar en el rumen, generan ácidos grasos volátiles (AGV). Estos ácidos son aprovechados como fuente de energía por el animal a través de distintos procesos metabólicos (Elizalde et al., 1993). Por su parte, la concentración energética permitirá altas producciones de leche y ganancias de peso individual. Sin embargo, estos materiales presentan un desbalance nutricional, dado que el contenido proteico se encuentra entre 5 y 8% de proteína bruta (Schroeder *et al.*, 2000; Di Marco, 2012), niveles que se encuentran por debajo o en el nivel mínimo de los requerimientos de

una vaca de cría o lechera (NRC 2000 y 2001). Así mismo con ese tenor proteico no se alcanzaría en el fluido ruminal una concentración de amoníaco suficiente para maximizar el crecimiento microbiano y la digestibilidad ruminal (Satter; Slyter, 1974). Se habló de la fuente de N y la concentración de amoníaco, de la energía disponible, de la fuente de carbohidratos; pero quedan otros nutrientes requeridos por los microorganismos que por requerirse en menor cantidad no son menos importantes. Tomando como ejemplo el azufre para la síntesis de metionina y cisteína o el fósforo para la síntesis de ácidos nucleicos (Ørskov 1992; Garriz y López; 2002).

Debido al desbalance planteado, es aconsejable acompañar los ensilajes de maíz y sorgo con el suministro de una fuente de nitrógeno (N) proteico o NNP que cubra el déficit y asegure una relación C:N adecuada (Preston; Leng, 1990; Milton; Brandt, 1994). Esto puede llevarse adelante a través de distintas estrategias, desde complementar la entrega de ensilaje con pastoreos estratégicos sobre verdeos o pasturas con leguminosas (Kilkenny, 1978), la inclusión de proteína verdadera como aditivo del silo hasta la inclusión de compuestos nitrogenados inorgánicos. Existen numerosos trabajos donde el eje de análisis es el origen de la fuente nitrogenada, siendo este de origen orgánico o inorgánico. En términos generales se plantea que la inclusión de proteína verdadera en la dieta asegura una adecuada provisión de aminoácidos esenciales, vitaminas, minerales y asegura un mayor crecimiento de la población microbiana (Mieres, 1997; Relling y Mattioli, 2002; Rovira, 2004). Sin embargo, resulta más frecuente el uso de fuentes de NNP como la urea, que el uso de proteína verdadera por su accesibilidad, estabilidad en la composición en cuanto a la concentración de nitrógeno y su costo (Marichal et al., 2009; Rovira, 2014). Si bien su empleo resulta de fácil aplicación, se debe tener recaudos sobre la cantidad y forma de entrega de la misma. Por un lado la urea no permitiría obtener una buena sincronización entre la disponibilidad de energía y de  $N-NH_3$  a nivel ruminal, debido a que se hidroliza rápidamente (Wallace; Cotta, 1988) y el ensilaje presenta una degradabilidad más lenta (Di Marco; Aello, 2002). Esta falta de sincronización marca un desacople entre fermentación y síntesis proteica, por lo cual el N no es transformado en proteína microbiana, generándose un aumento del  $N-NH_3$  (Ørskov, 1982; Visek, 1984). Éste es absorbido a través de la pared ruminal o expulsado hacia el abomaso, disminuyendo la eficiencia de la utilización del N para la síntesis microbiana (Church, 1974; Van Soest, 1994). Por otra parte, la rápida liberación conjuntamente con los niveles de entrega pueden llevar a situaciones de toxicidad (Bartley et al., 1976). Para contrarrestar este riesgo, sería necesario asegurar que los niveles de urea en la



formulación no superen el 3 % en el caso de alimentos concentrados, el 1,5 % de la dieta o que se restrinja el consumo a un tercio de la PC (Escanola et al., 2007; Repetto et al., 2003; Emerick, 1993).

Teniendo en cuenta esta limitante para el uso de urea en dietas compuestas por alimentos ensilados que presentan una lenta liberación de energía, se han probado y desarrollado diversas alternativas. Algunas de ellas se basan en el uso de una fuente energética como la melaza con la adición de urea, esto ha sido ampliamente estudiado, encontrando resultados dispares en cuanto a la eficiencia de utilización de la misma (Bowman et al, 1995). Por otro lado se encuentran los bloques nutricionales que contienen urea junto a otros ingredientes que aportan energía como pueden ser granos de cereales, oleaginosas o melazas con o sin adición de minerales. También se dispone de compuestos que contienen urea junto con aditivos (polímeros sintéticos) que la protegen, buscando que la liberación de N a nivel ruminal sea lenta (Marichal et al. 2009; DiLorenzo; DiConstanzo,2007; Currier et al., 2004; Cunha de Oliveira et al., 2004). Tal es el caso del Optigen® (Alltech Inc., 2008), el cual contiene urea recubierta por una película lipídica que asegura una liberación controlada de N en rumen.

Los rumiantes que consumen forraje de baja calidad (menor a 7%proteína cruda) pueden utilizar con eficacia NNP suplementario con forma de liberación muy disimiles (Currier et al 2004, Bohnert et al., 2000 b; Thomas; Armitage, 1972; Oltjen et al. 1969) y con frecuencias de suministro diarias o reducidas (poco frecuente) (Bohnert et al. 2002a; Wyatt 1982 y Huston et al. 1999 a) sin afectar negativamente la digestibilidad. DelCurto et al. 1990 y Bandyk et al. 2001 hallaron efectos sobre la digestibilidad y consumo de la materia seca (CMS) en función de la velocidad de liberación de N. Sin embargo Bohnert et al. (2002 a y b) en sus trabajos confirman que las diferencias observadas en CMS son independientes de la fuente, velocidad de liberación del N o frecuencia de suministro y se deben básicamente a la concentración de fibra detergente neutro (FDN) del alimento consumido. Esto también fue confirmado en parte por Krehbiel et al. (1998) y por Huston et al. (1999 a) quienes utilizando NNP con dos velocidades de liberación y distintas frecuencias de suministro, arribaron a las mismas conclusiones. En el trabajo de Machado Nogueira et al. (2005), informan diferencias en la dinámica de la liberación del N-NH<sub>3</sub> y destacan que podría no evidenciarse cuando el N de rápida liberación (urea) es sustituido por N de lenta liberación. Así mismo son numerosos los estudios que evaluando la suplementación con N de rápida o lenta disponibilidad en rumen, no detectan evidencias de una

respuesta favorable para una u otra velocidad de liberación sobre la digestibilidad o performance animal (Currier et al 2004). Farmer et al. (2002); Oltjen et al. (1974) y Thomas y Armitage, (1972) suplementando con fuentes de NNP de lenta y rápida liberación y en el caso del primer autor además con proteína, no detectaron efectos en la GPV en función de las distintas fuentes de N. Currier et al. (2004), sugieren también que la suplementación con NNP de rápida o lenta liberación son igualmente efectivas para usarse como suplemento en rumiantes que consumen alimentos con bajo porcentaje de proteína (menor a 7%). En base a estudios *in vitro*, una de las empresas que producen urea protegida (Optigen®) afirma que el producto libera el 50% del N en las primeras 12 horas luego de la ingestión, llegando la liberación al 95% a las 24 horas de consumido (Alltech Inc., 2008). La utilización del NNP de liberación controlada de marca registrada en dietas basadas en ensilaje podría ajustar adecuadamente las curvas de liberación de N y de energía. Esta liberación lenta en la urea protegida garantizaría un aporte de N en el rumen más constante a lo largo del día (Paula et al., 2009). Tal es así que la incorporación de una fuente de NNP de liberación lenta es una alternativa válida para mejorar la ganancia de peso vivo (GPV) (Marichal et al., 2009; Ammerman et al., 1972; Oltjen et al., 1969). En este marco se presenta como hipótesis que con alimentos de baja degradabilidad ruminal y con desacople entre la energía y el N, la suplementación con una fuente de NNP de liberación lenta generará un ambiente ruminal adecuado e incrementará la síntesis de proteína microbiana (SPM) asegurando un mejor aporte de nutrientes. De forma complementaria, si la fuente no proteica no fuese de lenta liberación la forma de dosificación podría tener efectos en la dinámica ruminal y en la síntesis proteica. Con el objeto de probar estas hipótesis, en dietas basadas en ensilaje de maíz, se evaluó el efecto de la suplementación con NNP de liberación controlada en dos formas contrastantes y con urea sobre las características del ambiente ruminal, la síntesis de proteína microbiana y diversos metabolitos plasmáticos.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1. Hipótesis

- a-En dietas basadas en ensilaje de maíz planta entera la utilización de NNP de liberación controlada (de marca registrada) en reemplazo de NNP (urea) convencional permite una mejor sincronización entre la oferta de energía y de N a nivel ruminal, generando los siguientes cambios:
  - aumento del pH ruminal,
  - aumento en la concentración ruminal de AGV y N-NH<sub>3</sub>,
  - aumento de la digestibilidad *in vivo* de la ración,
  - aumento de la síntesis de proteína microbiana,
  - aumento de la concentración de glucosa, N-NH<sub>3</sub> y triglicéridos en sangre.
  
- B- La frecuencia de suministro de NNP de liberación controlada de marca registrada no afecta:
  - los parámetros ruminales,
  - la digestibilidad *in vivo* de la ración,
  - la síntesis de proteína microbiana,
  - la concentración de metabolitos en plasma (glucosa, N-NH<sub>3</sub> y triglicéridos).

### 2. Objetivos

- **Objetivo general**

Estudiar el efecto de la suplementación con dos fuentes de NNP de diferente tasa de liberación del N, y la frecuencia de suministro, acompañando ensilaje de maíz de planta entera sobre los parámetros que caracterizan el ambiente ruminal, la síntesis de proteína microbiana y los principales metabolitos plasmáticos (glucosa, N-NH<sub>3</sub> y triglicéridos).

- **Objetivos específicos**

a) Determinar para cada fuente de NNP y frecuencia de suministro: la concentración ruminal de N-NH<sub>3</sub> y de ácidos grasos volátiles (AGV), el pH del rumen y la digestibilidad aparente *in vivo* de la MS (*Din vivo*MS %);

b) Precisar para cada fuente de NNP y frecuencia de suministro: la síntesis de proteína microbiana, el consumo de MS y el tiempo destinado a consumo y rumia;

c) Establecer para cada fuente de NNP y frecuencia de suministro: las concentraciones plasmáticas de urea, triglicéridos y glucosa.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar y período experimental

El experimento tuvo una duración de 80 días y se llevó a cabo durante los meses de octubre, noviembre y diciembre de 2009 en la Unidad Integrada Balcarce (EEA INTA Balcarce-Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP), partido de Balcarce, Provincia de Buenos Aires. Hubo tres períodos experimentales de 21 días cada uno, correspondiendo los primeros 15 días al período de acostumbramiento a la dieta y los últimos seis días a la toma de datos (fase experimental propiamente dicha).

#### 3.2. Tratamientos

Los tratamientos estuvieron definidos por las fuentes de NNP de rápida (urea) y liberación controlada de marca registrada (NNP-LC) y la frecuencia de suministro del mismo, de la siguiente manera:

- T1: NNP-LC suministrado en un pulso diario en rumen a través de una fistula,
- T2: NNP-LC, suministrado con la ración totalmente mezclado asegurando un consumo continuo,
- T3: Urea suministrada con la ración totalmente mezclado asegurando un consumo continuo.

#### 3.3. Animales

Se utilizaron tres novillos Hereford x Angus de 23 meses de edad promedio, con un peso promedio de  $363,33 \pm 13,05$  kg. Los animales, habían sido previamente intervenidos, disponiéndose una cánula ruminal de 11 cm de diámetro interno, y una cánula duodenal tipo T de 2,1 cm de diámetro externo. La cirugía para la colocación de las cánulas se realizó durante el año 2009, tomándose los recaudos de analgesia y asepsia necesarios para mantener la integridad y las condiciones de bienestar animal. Durante el desarrollo del experimento los animales estuvieron alojados en corrales individuales de 10 m<sup>2</sup> de superficie, con acceso permanente y recambio diario del agua de bebida.

Se determinó el peso vivo de los animales al inicio y al final de cada período experimental contabilizando 4 pesadas, sin desbaste previo y respetando el mismo horario del día con una balanza mecánica de hacienda con una capacidad hasta 1500 kg y una precisión de 1 kg.

### 3.4. Dieta suministrada

La materia seca (MS) de la dieta estuvo constituida por 98,07% de ensilado de maíz de planta entera, 1,6% de una fuente de NNP y 0,33% de sales minerales. Como fuentes de NNP se utilizaron urea (46%N) y NNP de liberación controlada de marca registrada (41%N), que dieron como resultado  $13,175 \pm 0,245\%$  PB en la ración siendo así una dieta isoproteicas. El aporte de sales minerales incluyó aquellos nutrientes deficitarios en el ensilaje de maíz como Ca, P, Cu, Mg y S. La cantidad de alimento entregado surgió de calcular el consumo de MS (CMS) potencial mediante el programa REQNOV(Fernández *et al.*, 1992) correspondiendo a 2,9% PV(10,54KgMS/a/d), El alimento fue ofrecido en bateas una vez al día durante las primeras horas de la mañana (6-8 am). De forma de mantener estable la cantidad de Kg MS entregados, se determinó el contenido de MS del silaje sobre una muestra diaria para detectar cambios en el contenido de humedad del mismo.

La dieta suministrada fue caracterizada al inicio y final de cada periodo experimental a partir de una sub-muestra que fue remitida al laboratorio de la EEA INTA Balcarce. Sobre la misma se realizaron las siguientes determinaciones:

- Materia orgánica (MO) por calcinación en mufla a 600°C,
- Fibra en detergente neutro (FDN) y fibra en detergente ácido (FDA) con equipo ANKOM<sup>200</sup> (ANKOM Corp., Fairport, NY), según Van Soest et al. (1991),
- Carbohidratos solubles en agua (CSA) por el método de la antrona-sulfurico (Pichard; Alcalde, 1990)
- Proteína bruta (PB), a través de la determinación del contenido de N por conductividad térmica en el equipo Leco FP-528 (Horneck; Miller, 1998). La PB se calculó como  $N \cdot 6,25$ .
- Almidón por método enzimático según MacRae; Armstrong (1968),
- Digestibilidad *in vitro* de la MS (DMS) en un incubador DAISY<sup>II</sup>(ANKOM Technology) a las 48 h.
- pH determinado con un peachimetro digital portátil Cole Palmer
- Materia seca (MS) en estufa a 60°C con circulación forzada de aire durante 48 h.

### 3.5. Cronograma del ensayo

Como se dijo anteriormente, cada fase experimental tuvo una duración de seis días consecutivos, durante los cuales se siguió el siguiente cronograma de trabajo:

Hora	Día	Día	Día	Día	Día	Día
0	•					‡
2		•				‡
4			•			‡
6	•⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	
8	Ω	• Ω	Ω	# Ω	Δ Ω	‡
10			•	#	Δ	‡
12	•			#		‡
14	Ω	• Ω	Ω	Ω	Ω	‡
16			•	#		‡
18	•			#		‡
20		•		#		‡
22			•			‡

**Figura 1:** Cronograma de actividades y horarios de muestreos durante la fase experimental.

**Referencias:** ⊙ entrega de alimento, • muestreo del contenido en duodeno (fistula) y colección de muestra de heces, ‡ Comportamiento animal, # Sangrado y caracterización ruminal, Δ Licor ruminal (purinas) y Ω dosificación del marcador.

### 3.6. Determinaciones de parámetros ruminales y sanguíneos

#### 3.6.1. Ambiente ruminal

Para caracterizar el ambiente ruminal se tomó en cada animal una muestra de licor ruminal en el día cuatro de la fase experimental (día 19 del periodo), en los siguientes horarios: hora 0, previo a la entrega de la ración (antes de las 8 am), y a 1, 2, 4, 8 y 12 horas posteriores a la entrega del alimento (Figura 1). Las muestras se extrajeron en forma manual de los diferentes sacos del rumen para construir una muestra representativa del mismo. El contenido ruminal se filtró a través de cuatro telas de quesería, e inmediatamente se evaluó el pH del licor con un peachímetro digital portátil Cole Palmer. Se tomaron dos alícuotas, una de 100 ml de licor a la cual se agregó 1 ml de ácido sulfúrico puro para determinar la concentración de ácidos grasos volátiles (AGV), y otra de 4 ml de licor a la que se adicionó 4 ml de ácido clorhídrico 0,2 N para la determinación de nitrógeno amoniacal (N-NH<sub>3</sub>). Las muestras se conservaron a -20°C hasta su análisis. Los AGV se determinaron mediante cromatografía gaseosa (Cromatógrafo Cow-Mac 69-750P), y la concentración de N-NH<sub>3</sub> se determinó en el sobrenadante luego de descongelar y centrifugar las muestras a 9500 rpm durante 10 minutos mediante Autoanalizador Technicom, modelo 2, 1970.

#### 3.6.2. Digestibilidad aparente *in vivo*

La determinación de la Digestibilidad *in vivo* aparente, conlleva la medición de dos parámetros, por un lado la cantidad de MS consumida (CMS Kg/a/d) y por otro lado la cantidad de MS excretada.

El CMS individual real se determinó por diferencia entre el peso del material ofrecido y del remanente. Para ello, diariamente durante la fase experimental se tomó una muestra del alimento ofrecido y del remanente, las cuales se secaron en estufa a 60°C con circulación forzada de aire durante 48 h. para determinar el contenido de MS. Por otra parte para la determinación de MS excretada se suministró un marcador de flujo de digesta.

Para determinar el contenido de MS excretada en heces se utilizó como marcador externo de la fase sólida el sesquióxido de cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), el cual fue dosificado manualmente, vía fístula ruminal, a razón de 12 g/día, dividido en dos aplicaciones (8 a.m. y 2 p.m.; Figura 1) para mantener una concentración conocida y constante en la ración (Doley *et al.*, 1994, Kotb y Luckey, 1972). La dosificación comenzó al quinto día de cada fase de acostumbramiento y se extendió hasta el quinto día de la fase experimental, totalizando 16 días. La concentración de Cr en heces se determinó por mineralización nítrico-perclórica-adsorción visible en el laboratorio de Química Analítica de la Unidad Integrada Balcarce.

La toma de muestras de heces se realizó de la siguiente manera, durante los primeros tres días de cada una de las fases experimentales (día 18 de cada período), se tomaron manualmente muestras de heces, cada 6 h., la hora de toma de muestra de cada día, se desfasó en 2 h, para generar en el total de los días una secuencia de 12 muestras en 24h. Las muestras se conservaron a -20°C y luego se acondicionaron para su análisis, secándolas en estufa con ventilación forzada de aire a 60°C hasta alcanzar peso constante. Seguidamente, se confeccionó una muestra compuesta por animal, tomando una sub-muestra de 10g MS de cada una.. Esta muestra compuesta fue molida en un molino Willey con malla de 1 mm, y se determinó la concentración del marcador (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) La estimación de la cantidad total de heces producidas (kg MS/animal/día) se obtuvo relacionando la concentración del marcador dosificado en rumen y en heces ([Cr] ración/[Cr] heces). La digestibilidad aparente *in vivo* se calculó como la diferencia entre la cantidad de MS consumida y la excretada en heces a través de la siguiente expresión (Galyean, 1997):

$$\text{digestibilidad aparente in vivo} = \frac{\text{MS consumida} - \text{MS de heces producidas}}{\text{MS consumida}}$$



### 3.6.3. Síntesis de proteína microbiana (SPM)

Para la determinación de la proteína microbiana, se evaluaron muestras de contenido ruminal y duodenal. Sobre ellas se deben determinar un conjunto de parámetros entre los que se encuentra:

- Materia orgánica (MO), determinada por calcinación en mufla a 600°C,
- Nitrógeno total (NT), determinado por conductividad térmica en un equipo Leco FP-528 (Horneck; Miller, 1998),
- Concentración del marcador externo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), estimado por mineralización nítrico-perclórica-adsorción visible
- Concentración de purinas determinada según Zinn y Owens (1986). Como estándar se utilizó ARN de levaduras (R6625; Sigma, St. Louis, MO, USA) y según protocolo se efectuaron seis repeticiones para cada observación, para absorber la variabilidad propia de la técnica.

Durante los primeros tres días de cada una de las fases experimentales, se tomaron muestras de contenido duodenal de aproximadamente 500ml con un vaso de precipitados. Este muestreo, se ajustó al cronograma de mediciones mostrado en la Figura 1 respetando la secuencia descrita para la toma de muestras de heces. Sobre el total de las muestras, se confeccionó una muestra compuesta de la digesta diaria por animal, tomando una alícuota de 100ml de cada una. Estas muestras compuestas se conservaron a -20°C para su posterior análisis. Previo al análisis, se acondicionaron (descongelado y homogeneización) para volver a ser congeladas para su posterior liofilización. Las muestras de contenido duodenal liofilizadas se molieron en un molino Willey con malla de 1 mm, así acondicionadas se utilizaron para las determinación de los parámetros mencionados con anterioridad.

Por otra parte, en el día cinco de la fase experimental se extrajo una muestra (2,25 L) del licor ruminal. Las muestras se tomaron en forma manual de los diferentes sacos del rumen, para construir una muestra representativa del mismo. El contenido ruminal se filtró a través de cuatro telas de quesería. Inmediatamente, las muestras se centrifugaron en centrifuga refrigerada (500×g, 20 minutos a 4°C), con el objeto de separar las partículas de alimento presentes en el licor. El sobrenadante (1,5 L) de esta primera centrifugación se volvió a centrifugar (24000×g, 26 minutos a 4°C), obteniéndose así un pellet de microorganismos ruminales. Este precipitado fue

conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta ser liofilizado. Luego, sobre este extracto de bacterias, se determinó la concentración de bases púricas según se indicó anteriormente. Así mismo se determinó MO, NT y la concentración del marcador externo.

Para completar el cálculo de la proteína microbiana se debió estimar la cantidad de MS degradada en rumen en función de la diferencia de concentración del marcador según la siguiente expresión:

$$\text{MS degradada en rumen (kgMS/a/d)} = \text{MS digestible} * (\% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ rumen} / \% \text{Cr}_2\text{O}_3 \text{ en duodeno}).$$

La diferencia entre MS digestible y MS degradada permitió calcular la MS que salió del rumen (MS en duodeno). A partir de los porcentajes de MO y NT presentes en rumen y duodeno, del contenido de MS degradada en rumen y de la MS en duodeno, se obtuvo el contenido de MO y de NT en ambos sitios (rumen y duodeno). A partir del NT se obtuvo la cantidad de PB, utilizando la siguiente relación  $\text{PB} = \text{NT} * 6,25$ . La cantidad de purinas totales en rumen y duodeno ( $\text{g purina}_{\text{sitio}} * \text{kg MO}_{\text{sitio}}$ ), corregidos por el contenido de N en las bases púricas, permitió calcular el N microbiano. Finalmente, la SPM (g/día) se estimó a partir del N microbiano y se utilizó el factor 6,57 para transformar el contenido de N en proteína microbiana (Dehority, 2003). Relacionando la SPM (g/día) y la cantidad de MO degradada en el rumen (MODR) se calculó la eficiencia de síntesis ( $\text{SPM g/día} / \text{kg MODR}$ ), (Galyean, 1997).

#### **3.6.4. Metabolitos sanguíneos**

En el día cuatro de la fase experimental, y con la misma secuencia horaria en la cual se caracterizó el ambiente ruminal (0, 1, 2, 4, 8, 12 h. post-alimentación), se extrajo una muestra de sangre de vena yugular (50ml por animal). Las muestras se colectaron en tubos conteniendo EDTA (350U/ml.) e inmediatamente se centrifugaron a 3000 rpm por 15 minutos, extrayéndose posteriormente el plasma sobrenadante. Éste fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para luego determinar la concentración de urea, triglicéridos (TG) y glucosa (GL) utilizando kit enzimáticos (Wiener Laboratorios Rosario S.A.I.C.).

#### **4.6.5. Comportamiento animal**

En el último día (día 21) de cada una de las tres fases experimentales, se evaluó el comportamiento ingestivo (CI) en cada uno de los tres animales para disponer de información sobre momentos y tiempo total destinado por el animal a

consumir la ración, la rumia o el descanso (Figura 1). Para ello se realizaron observaciones visuales directas durante un período de 24h con lecturas de “barrido” donde se registraba la actividad de cada uno de los 3 animales, cada 5 minutos, bajo el supuesto de que la actividad registrada continuó en los siguientes cinco minutos (Hodgson; Illus, 1982), teniendo como referencia las actividades de rumia, consumo de materia seca (CMS) y descanso incluyendo aquí la ingesta de agua. El tiempo destinado a cada actividad, surge de la suma de los eventos identificados para cada una a lo largo de todo el día, siendo los mismos expresados como número de horas y en términos relativos como porcentaje sobre el total de las 24 hs. Esto da un total de 288 registros para cada uno de las 3 fases.

### 3.7- Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño del experimento fue un cuadrado latino (DCL) 3x3, con tres fases experimentales (ponerlas), tres animales (repeticiones) y tres tratamientos (NNP-LC en la ración, NNP-LC via ruminal y urea en la ración). El modelo estadístico lineal para el experimento fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \rho_i + \gamma_j + \tau_k + \varepsilon_{ij}$$

Donde:

$y_{ij}$ : es la observación de la unidad experimental en el i-ésimo animal y el j-ésimo período; variable dependiente

$\mu$ : Efecto medio o media general

$\rho_i$ : Efectos de la i-ésima fila o animal

$\gamma_j$ : Efectos de la j-ésima columna o período

$\tau_k$ : Efectos del k-ésimo tratamiento

$\varepsilon_{ij}$ : Errores experimentales

Para evaluar las variables que describen el ambiente ruminal (pH, AGV y N-NH<sub>3</sub>) y los parámetros sanguíneos (GL, TG y uremia) el modelo estadístico fue el siguiente:

$$y_{hij} = \mu + \tau_l + \gamma_j + \alpha_h + \delta_n + \varepsilon_{hij} + \tau_l \gamma_j$$

Donde:

h : individuo, l: tratamiento, j: hora y n: período

$y_{hij}$ : Es una unidad particular h o variable dependiente

$\mu$ : Media general

$\tau_l$ : Desvío desde la  $\tilde{y}..$  asociada al tratamiento

$\gamma_j$ : Desvío desde la  $\tilde{y}..$  asociada a la hora

$\alpha_h$ : Desvío desde la  $\tilde{y}..$  asociada al animal

$\delta_N$ : Desvío desde la  $\tilde{y}..$  asociada al período

$\tau_l\gamma_j$ : Desvío desde la  $\tilde{y}..$  asociada a la interacción del tratamiento y la hora

$\varepsilon_{hij}$ : Error experimental

Las variables de ambiente ruminal (pH, AGV y N-NH<sub>3</sub>) y los metabolitos sanguíneos (TG, uremia y GL) se analizaron como medidas repetidas en el tiempo. Mediante el procedimiento PROC MIXED de SAS® 9.1 (SAS, 2009) se eligió la estructura de matriz de covarianza que ajustó mejor. Los niveles de significancia se establecieron de la siguiente manera, para ambos modelos

$p \leq 0,05$ : Diferencias significativas

$p \leq 0,10$ ;  $p \geq 0,5$ : Tendencias

El modelo utilizado para los análisis de varianzas de las variables CMS, digestibilidad aparente *in vivo*, CI y SPM fue el siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \rho_i + \gamma_j + \tau_k + \varepsilon_{ij}$$

i, j y k = 1,2 y 3 tratamientos.

$y_{ij}$ : es la observación de la unidad experimental en el i-ésimo animal y la j-ésimo período; variable dependiente.

$\mu$ : Efecto medio o media general.

$\rho_i$ : Efectos de la i-ésima fila o animal

$\gamma_j$ : Efectos de la j-ésima columna o período

$\tau_k$ : Efectos del k-ésimo tratamiento

Mediante el procedimiento GLM de SAS® 9.1(SAS, 2009) se analizaron dichas variables con un nivel de significancia de  $p \leq 0,05$  para diferencias significativas y  $p \leq$

0,10 para indicar tendencias.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Calidad del ensilaje de maíz

El ensilaje entregado aportó 2,43 Mcal EM/kg MS, considerando la digestibilidad de la materia seca (DMS) que fue del 67,3% (Cuadro N° 1). Como puede observarse en el Cuadro N° 1, todos los parámetros empleados para caracterizar el alimento, presentaron una baja dispersión. Esta dispersión se corresponde a datos provenientes de muestras tomadas a lo largo de los tres períodos. De esta forma se puede asegurar que la calidad del alimento no varió a lo largo de todo el ensayo, considerando que los coeficientes de variación se encontraron por debajo del 15 %, exceptuando el contenido de almidón. El que resulta importante analizar es el contenido de proteína bruta del alimento, que resultó superior respecto de valores de entre 4 y 7 % normalmente encontrados en los ensilajes, de esta forma, se observa un 8,9 %.

**Cuadro N° 1:** Caracterización nutricional del ensilaje de maíz de planta entera.

Item	pH	DMS (%)	Composición química (%)						
			MS	MO	PB	FDN	FDA	CSA	Alm.
Prom	3,88	67,3	32,0	90,2	8,9	45,0	22,6	6,4	19,9
DS	0,04	3,20	3,08	2,72	0,62	5,47	1,35	0,78	4,79
CV%	1,08	4,75	9,63	3,02	6,97	12,16	5,97	12,19	24,07

**Referencias:** MS: materia seca. MO: materia orgánica. DMS: digestibilidad de la materia seca. PB: proteína bruta. PV: proteína verdadera. FDN: fibra detergente neutro. FDA: fibra detergente ácido. CSA: carbohidratos solubles en agua; Alm.: almidón. Prom: Promedio. DS: desvío estándar.

### 4.2. Peso, consumo (CMS), Digestibilidad aparente *in vivo*, heces (kg MS producidos) y comportamiento ingestivo.

El peso de los animales se mantuvo sin diferencias estadísticas ( $p > 0,05$ ) siendo el peso medio de salida de  $417,66 \pm 42,15$  kg. El CMS total de la dieta no difirió entre tratamientos ( $p=0,7$ ) y fue en promedio  $10,018\text{kg} \pm 0,37$  MS/animal/día, lo cual representó el 2,4% del peso vivo y fue el 96,33% de lo entregado. La digestibilidad aparente *in vivo* de la MS (DivMS) no se diferenció entre tratamientos ( $p=0,73$ ) y fue en promedio de  $69,7 \pm 0,98\%$ , siendo los valores medios para cada tratamiento de 68,24% (T1), 69,85% (T2) y 71,04 % (T3).

Así mismo los Kg MS de heces producidas no difirió entre tratamientos ( $p=0,64$ ) y fue en promedio  $2,87 \pm 0,0095$  Kg MS /animal/día; siendo los valores medios para cada tratamiento de 2,88 Kg MS (T1), 2,86 Kg MS (T2) y 2,87KgMS (T3).

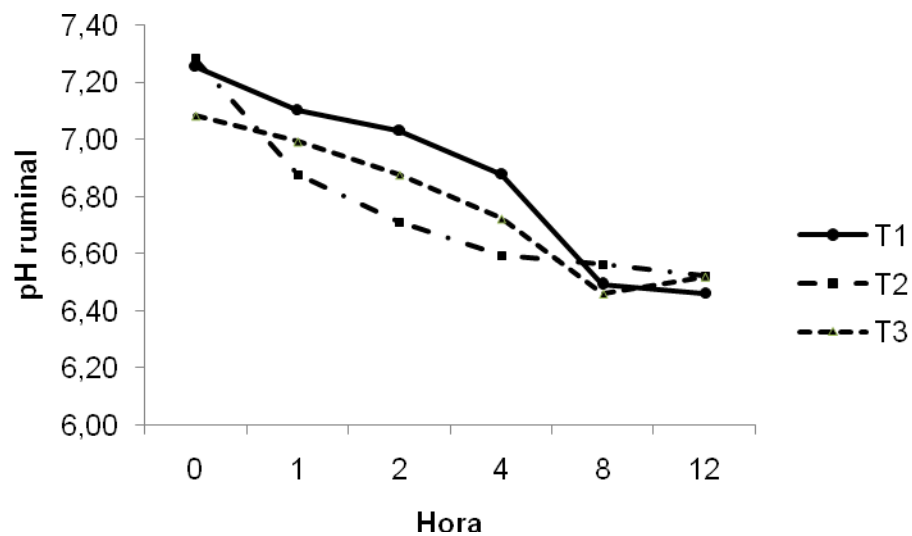
No hubo efecto del tratamiento en ninguna de las variables de Comportamiento ingestivo analizadas. El tiempo destinado al consumo (minutos totales) fue en promedio de 307,2 min. /día ( $p=0,75$ ), sin detectarse tampoco diferencias entre animales ( $p=0,24$ ) y períodos ( $p=0,27$ ). El tiempo destinado a la rumia (minutos totales) fue en promedio de 595 min. /día ( $p=0,91$ ) para los tres tratamientos, sin diferencias entre animales ( $p=0,88$ ) ni períodos ( $p=0,13$ ), siendo el tiempo destinado al descanso de 537,8 min/día. En términos generales, los animales destinaron el 22 % del día al consumo, 41 % a la rumia y 37 % al descanso.

#### **4.3. Parámetros del ambiente ruminal**

No hubo efecto de los tratamientos en ninguno de los parámetros que caracterizan el ambiente ruminal. En el caso del pH y la concentración de N-NH<sub>3</sub>, se observó como es de esperar una variación significativa a lo largo del día (Cuadro N°2). En el caso de la [N-NH<sub>3</sub>], existe una interacción entre la hora de muestreo y el tratamiento (Cuadro N°2, Figura N°3). Por ese motivo se consideró analizar las diferencias entre tratamientos para cada hora en particular. Cuando se analizan los valores medios en el total del período de muestreo (24 hs) los valores medios de pH fueron de 6,8; sin embargo se observó una variación del 15%. Siendo el valor mínimo promedio de pH 6,5y máximo promedio de pH 7,2. Además estos valores promedios máximos se presentan en la hora 0 para todos los tratamientos y los valores promedios mínimos en la hora 8(Figura 2). Al considerar la [N-NH<sub>3</sub>], se observa que el valor promedio de todos los tratamientos fue de 40,17 mg/dl; sin embargo dada la existencia de efecto de la hora y su interacción con el tratamiento, cuando se analiza en la hora 1la concentración de N-NH<sub>3</sub> fue en el T1 de 80 mg/dl, siendo este valor 39 y 35% mayor ( $p<0,05$ ) que en T2 y T3 respectivamente, mientras que T2 y T3 no difirieron entre si. Cuando se analiza la situación en la hora 8, se observa que se invierte el orden, siendo el de mayor concentración el T3 con un valor de 70 mg/dl y 40% más alto ( $p<0,05$ ) que el de T2 y éste, a su vez, 65% más elevado ( $p<0,05$ ) que el de T1(16,9 mg/dl). Un segundo análisis que puede realizarse, es determinar la amplitud entre los valores máximos y mínimos registrados a lo largo del día, en este caso el T1 mostro una amplitud de 63,7 mg/dl con máximo valor en hora 1 y mínimo en hora 8, siendo su variación relativa de 376,92%.En el caso del T2 su amplitud fue de 22,07 mg/dl con

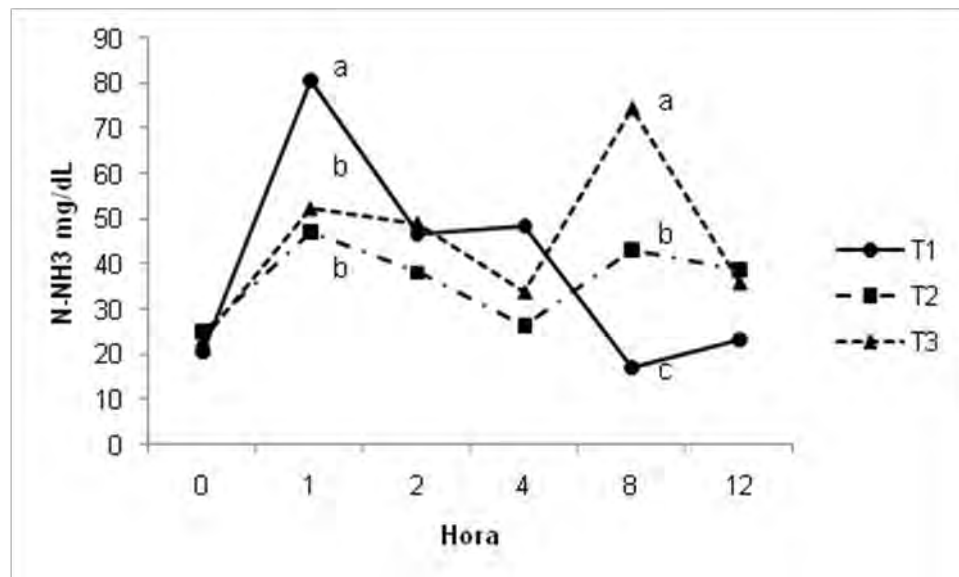
mínimos en la hora 0 y máximo en la hora 1 con una amplitud relativa del 88,14%. En T3 se detecto una amplitud relativa del 222,13% (51,4 mg/dl) con máximo en la hora 8 y mínimo en la hora 0. Por último se puede mostrar que el T1 presentó desde la hora 1 hasta la hora 4 valores de  $[N-NH_3]$  por encima de los valores mínimos para asegurar la actividad bacteriana, mientras que para el T2 siempre se encontró por encima de este valor mínimo y el T3 también superó este valor en todas las horas menos en la hora 0 previo al suministro de alimento (Figura N°4).

El último parámetro para caracterizar el ambiente ruminal es la concentración de AGV, la cual fue en promedio para todos los tratamientos y para todo el período (24 hs) de 120 mMol/L, de los cuales el 67,2% correspondió al ácido acético, el 23,4% al ácido propiónico, el 9,0% al ácido butírico y el 9,4% a otros ácidos, siendo la relación acético: propiónico media de 2,8 (Cuadro N° 2).



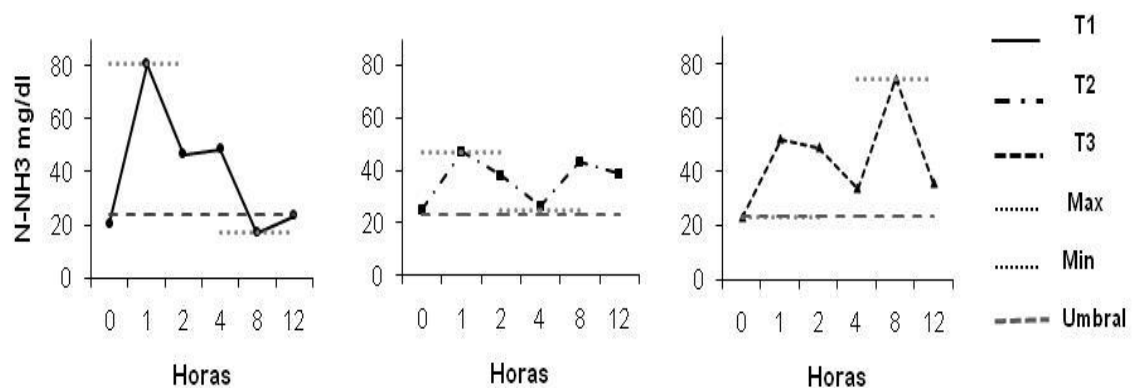
**Figura N° 2:** Caracterización de ambiente ruminal por la variable pH a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3).





**Figura N° 3:** Concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal (mg/dl) a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

**Referencia:** letras distintas indican diferencia estadísticas significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura N° 4:** Amplitud entre valores máximos y mínimos de la concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal (mg/dl) a lo largo del día y horas por encima del valor umbral de concentración de N-NH<sub>3</sub> ruminal necesaria para hacer eficiente la síntesis de proteína microbiana, en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

**Cuadro N° 2:** Parámetros ruminales en los animales del ensayo. T1: con NNP-LC en dosis única; T2: NNP-LC mezclado en la ración y T3 urea mezclada con la ración.

Variables	Tratamientos				Valor p		
	T1	T2	T3	EEM	T	H	T*H
pH	6,87	6,76	6,78	0,14	0,49	<0,01	0,88
N-NH <sub>3</sub> (mg/dl)	39,35	36,39	44,77	3,16	0,36	<0,01	<0,01
AGV Totales (mMol/L)	119,46	116,39	124,19	12,39	0,91	0,58	0,98
Ac. Acético (mMol/L)	80,61	77,57	83,59	8,97	0,89	0,61	0,98
Ac. Propiónico (mMol/L)	27,89	28,17	28,17	2,05	0,92	0,47	0,95
Ac. Butírico (mMol/L)	10,66	10,36	11,33	11,33	0,77	0,49	0,97
Relación Acét.:Propiónico	2,84	2,71	2,85	0,12	0,70	0,10	0,85

**Referencias:** EEM: error estándar de la media; T: tratamiento; H: hora; T\*H: interacción tratamiento por hora.

#### 4.4. Síntesis de proteína microbiana (SPM)

En el Cuadro N° 3 se muestran los valores promedio para cada tratamiento de las variables utilizadas para el cálculo de la SPM. Como se observa, salvo en la degradabilidad (Deg%) en ninguna de ellas hubo efecto del tratamiento.

**Cuadro N° 3:** Valores promedio de las variables utilizadas para calcular la síntesis de proteína microbiana (SPM) en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

	Tratamientos				Valor P
	T1	T2	T3	EEM	
MS Dig g/d	9172,25	9520,24	9912,62	560,03	0,70
Deg.%	47,23	50,35	43,5	0,32	≤0,001
MODR g/d	2036,58	2161,22	2337,25	182,78	0,18
MONDRg/d	362,52	426,28	417,95	119,29	0,32
PuTr g/d	2,54	2,57	2,47	0,061	0,62
PuTd g/d	2,59	2,66	2,52	0,045	0,29
HTKg/d	2,87	2,86	2,87	3,31	0,95

**Referencias:** MS Dig g/d: materia seca digestible en gramos por día; Deg.: degradabilidad de la MS; MODR: materia orgánica degradable en rumen; MONDR: materia orgánica que sale del rumen a duodeno; PuTr: purinas totales en rumen; PuTd: purinas totales en duodeno; H.T.: MS de heces totales en Kg por día.

Como consecuencia de lo señalado, la SPM no se diferenció estadísticamente entre tratamientos ( $p=0,87$ ) y fue en promedio de 159,98g/día. La eficiencia de la SPM

también fue similar entre tratamientos ( $p=0,20$ ) y alcanzó un valor promedio de 84,39 g/kg MODR (Cuadro N°4).

**Cuadro N° 4:** Síntesis de proteína microbiana (SPM) y eficiencia de la síntesis en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos frecuencias de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

	Tratamientos			EEM	Valor p
	T1	T2	T3		
SPM (g/día)	161,19	162,57	156,17	5,85	0,87
Eficiencia (g/kg MODR)	93,32	84,85	75,01	4,81	0,51

**Referencias:** EEM error estándar medio.

#### 4.5. Metabolitos plasmáticos

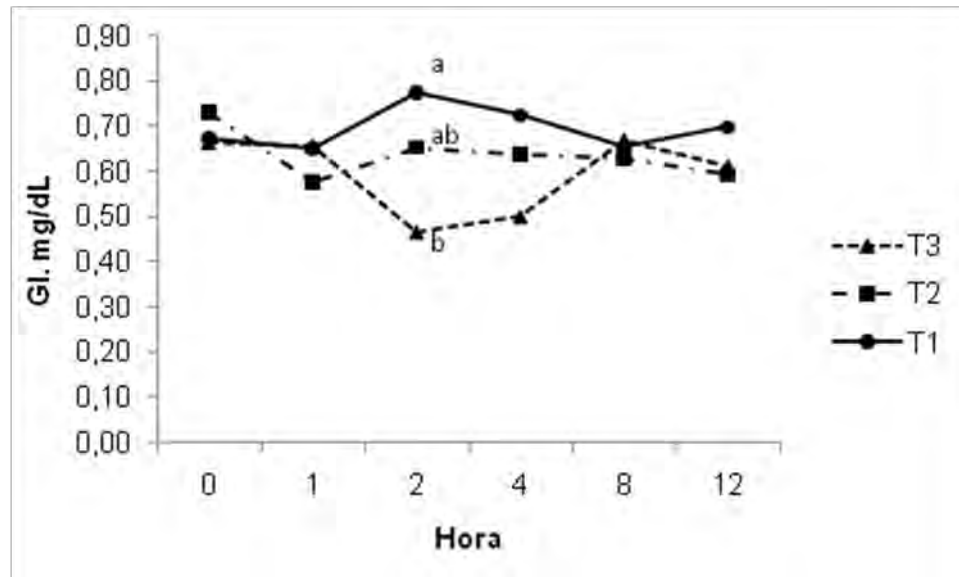
No hubo diferencias entre tratamientos en los niveles de glucosa ni de urea sanguínea. En cambio, los triglicéridos fueron más altos en las dietas con NNP-LC(T1 y T2) que en la dieta con urea (T3), (Cuadro N° 5).

**Cuadro N° 5:** Concentración de metabolitos plasmáticos en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

Variables	Tratamientos			EEM	Valor p		
	T1	T2	T3		T	H	T*H
GL mg/dl	0,69	0,65	0,59	0,04	0,39	0,97	0,79
Uremia g/L	0,21	0,18	0,19	0,01	0,31	0,36	0,03
TG g/L	0,29 a	0,31 a	0,26 b	0,01	0,02	<0,01	0,63

**Referencias:** GL: glucemia; TG: triglicéridos; EEM: error estándar de la media; T: tratamiento; H: hora; T\*H: interacción tratamiento por hora. (a, b, c) letras distintas indican diferencias estadísticas significativas.

Para la glucosa no hubo efecto de horario ni interacción tratamiento por hora (T\*H), si bien se evidenció una tendencia ( $p = 0,08$ ) a una mayor glucemia en la hora 2 para T1 respecto a T3 (Figura N° 5).

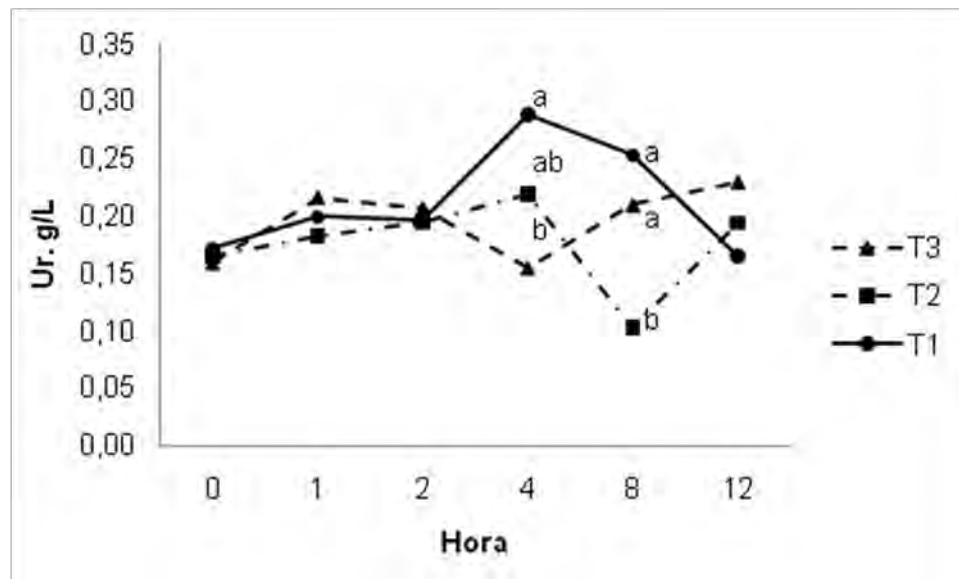


**Figura N° 5:** Concentración de glucosa en plasma (GL) a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

**Referencia:** letras distintas indican tendencia a diferenciarse significativamente ( $p > 0,05$ ;  $p < 0,10$ ).

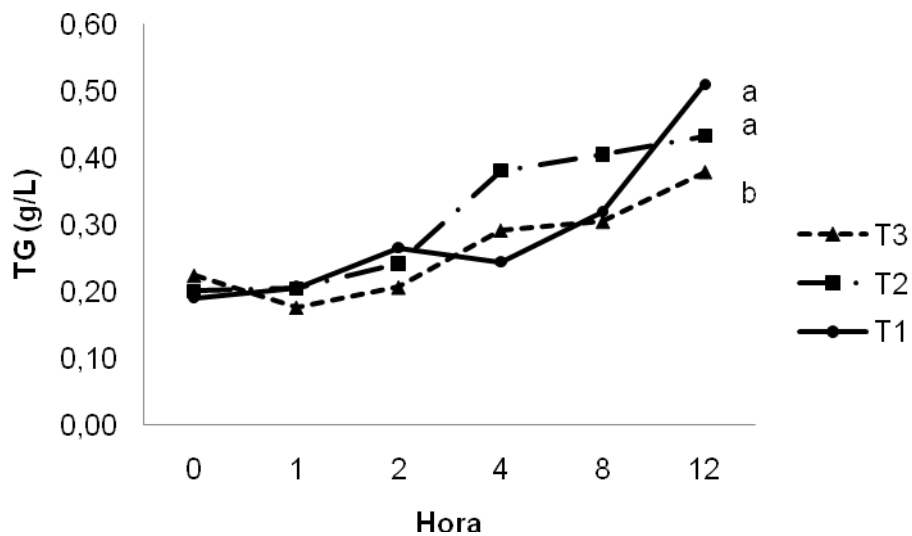
La concentración plasmática promedio de urea mostró una interacción tratamiento\*hora significativa (Cuadro N° 5). En la hora 4 la uremia en T1 (0,30 g/L) fue prácticamente un 100% mayor ( $p = 0,01$ ) que en T3, lo cual se condice con el pico observado en la concentración de  $N-NH_3$  (Figura N°3). En cambio, en la hora 8 los valores en T1 y T3 no se diferenciaron entre sí, mientras que ambos resultan superiores al de T2 ( $p = 0,003$ ) (Figura N° 6).

La concentración de triglicéridos en plasma mostró un efecto significativo de la hora y del tratamiento (Cuadro N° 5). Como lo indica la Figura N°7, todos los tratamientos se mantuvieron relativamente constantes en las primeras dos horas post-ingestión del alimento, aumentando hacia la hora 12.



**Figura N°6:** Concentración de urea (Ur) en plasma en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

**Referencias:** (a, b) letras diferentes indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).



**Figura N° 7:** Concentración de triglicéridos (TG) en plasma a lo largo del día en novillos alimentados con ensilaje de maíz suplementados con NNP-LC en dos formas de suministro (T1 y T2) o urea (T3).

## 5. DISCUSIÓN

Al momento de decidir la implementación de una suplementación proteica, se debe tener en cuenta las características nutricionales del alimento, los patrones de consumo en los animales y la eficiencia de utilización de los productos de la digestión, dado que están íntimamente relacionados con la cantidad, el tipo y actividad de los microorganismos ruminales que a su vez modulan la sincronización de la liberación de los nutrientes afectando la eficiencia de la dinámica ruminal (Bodine; Purvis, 2003; Bach et al., 2005b; Obispo, 2005; Hersom, 2008; Hall; Huntington, 2008). La disponibilidad de nutrientes para la síntesis microbiana y en consecuencia para la provisión de aminoácidos esenciales al animal, estará condicionada en primera medida por la calidad del alimento, su digestibilidad y el balance entre carbono y nitrógeno. De esta forma resulta importante remarcar que en el presente trabajo, el alimento base, ensilaje de planta entera de maíz requería ser complementado con suplemento proteico, de esta manera la DIV% y el contenido de PB de la ración se encontraron dentro de los niveles propuestos por distintos autores (Phipps, 1978; Cairnie, 1981; Stritzer, et. al., 1983 y Wales, et al., 1993; NRC, 2001; Siciliano-Jones y St. Pierre, 1997; Satter et al., 1999; Nomdedeu y Di Marco, 2001 y Di Marco, Aello, 2005), siendo algo superiores a los presentados por Schroeder et. al., (2000). Al considerar la *Din vivo* MS (*DivMS*) en el presente trabajo, se observa que la misma es mayor a la Digestibilidad in vitro de la materia seca (DIV%) coincidentemente con los valores aportados por otros (Ørskov, E. R. 1976; Kennedy et al., 1980; Preston y Leng, 1986; Preston y Leng 1989; Preston y Leng, 1990; Forbes, 1992; Milton; Brandt, 1994 b) y resultó un 30% mayor a la *DivMS* presentada por diversos autores que emplearon dietas con menor contenido de almidón (Siciliano-Jones y St. Pierre, 1997; Satter et al., 1999; Nomdedeu y Di Marco, 2001 y Di Marco, Aello, 2005) e incluso de los datos observados en raciones que contuvieron cantidades de almidón similares (Moran; Pritchard, 1987; Wales, et al., 1993), pero no se vio modificado el consumo (CMS). De este modo, la ración utilizada en el presente trabajo dispuso de los nutrientes necesarios para hacer eficiente la actividad microbiana, la sincronía en la liberación de nutrientes y la dinámica ruminal.

En el presente trabajo se pone en consideración el tipo de fuente de NNP utilizada y la frecuencia de suministro de la misma y se evidencia que tanto las fuentes de NNP y como la frecuencia de dosificación no generaron diferencias en la digestibilidad (*DivMS*) ni en la cantidad de material consumido. La ausencia de efecto

del tipo de fuente nitrogenada y la frecuencia de dosificación sobre la digestibilidad y el consumo ha sido evidenciada por numerosos trabajos, en los que se han empleado distintos tipos de alimento de base pero con la condición de que los mismos fuesen considerados fibrosos (Oltjen et al., 1969; Plummer et al., 1971; Chicco et al., 1971; Huber, 1975; Slyter L.L. et al., 1979; Mertens 1984,1985; Galyean y Owens, 1991; Bohnert et al.,2002 a; Currier et al., 2004; Taylor-Edwards, et al., 2009 b). Esta ausencia de efecto, podría estar explicada por las características del ensilaje de planta entera de maíz utilizado en el presente ensayo, el cual como se dijo anteriormente presentó niveles proteicos y digestibilidad *in vitro* superiores a los valores medios (67,3 %DIV, 8,9 %PB y 2,4 EM Mcal). De esta forma, los nutrientes liberados a partir del ensilaje llevarían a cubrir los requerimientos mínimos para el desarrollo correcto de la actividad microbiana ruminal (Stritzler, et al., 1983). Cuando existe una adecuada actividad microbiana, se tiende a un nivel constante de ingestión (Baumgardt, 1974). Los autores Bohnert et al., (2002 a y b); Ferrel et al., (1999); Krehbiel et al., (1998); Ammerman et al., (1972); Chico et al., (1971); Egan, (1965) observaron que aun en ausencia de efectos sobre consumo y digestibilidad se veía afectada la dinámica del nitrógeno. Por ello, es importante remarcar para el presente trabajo es que aunque no hay efecto sobre el consumo o la digestibilidad *in vivo* de la materia seca, la dinámica del nitrógeno se vio modificada.

En este trabajo la disponibilidad de N-NH<sub>3</sub> en rumen presentó diferencias como consecuencia de la frecuencia de entrega y del tipo de fuente. Resultados similares se observaron con dietas iso energéticas (2,4 Mcal EM) (Plummer et al., 1971; Huber, 1975). Los valores máximos observados estaban en el rango de 80 a 70 mg/dl, aun así los excesos de N-NH<sub>3</sub> en rumen no tuvieron incidencia en el patrón de consumo de los animales; a diferencia de los aportes que mencionan Valkeners et al., (2006); Forbes, (2007) y Gregorini, (2011) en sus trabajos. Las mayores amplitudes en la concentración de nitrógeno amoniacal ruminal no superaron las primeras ocho horas post alimentación siendo el periodo más corto para el T2; en coincidencia con trabajos que aseveran que la concentración máxima de amoníaco se alcanza generalmente unas dos a cuatro horas después de la ingesta de los alimentos que aportan nitrógeno (Garriz; Lopez, 2002; Taylor-Edwards *et al.*, 2009 a). Aun así no se encontraron diferencias entre tratamientos ya que estas variaciones en la concentración habrían sido mitigadas por procesos fisiológicos y por la capacidad de los rumiantes de reciclar nitrógeno, como exponen Bondi, (1988) y Cole; Todd, (2008). Como era de esperar, en el trabajo se encontraron variaciones en las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en las horas 1

y 8 post alimentación. Estos valores se hallan dentro del rango de concentraciones de N-NH<sub>3</sub> (8 a 80 mg/dl) observados con la utilización de raciones a base de ensilajes de maíz suplementadas con distintos niveles de NNP (30 g a 140g de urea) (Mehrez *et al.*, 1977; Rogers, *et al.*, 1986; Di Marco; Aello, 2002; Machado Nogueira *et al.*, 2005). Si se tienen en cuenta las conclusiones de Preston; Leng, (1986); Hoover, (1986) y Leng (1990), los valores de N-NH<sub>3</sub> tampoco habrían sido limitantes de la síntesis de proteína en ninguno de los tres tratamientos; ya que la concentración óptima para el máximo crecimiento microbiano es de 23,5 mg/dl N-NH<sub>3</sub> (Mehrez, *et al.*, 1977 (in vivo); Clark; Davis, 1983; Clark *et al.*, 1992; Bach *et al.*, 2005a; Bach *et al.*, 2005 b). Esta concentración se supero en la mayoría de las horas post alimentación salvo en el T1 en la hora 8 post alimentación. Cambios en la concentración de N-NH<sub>3</sub>, han sido puestos en evidencia por algunos autores (Pereira *et al.*, 2007), que muestran una asincronía entre las fuentes de energía y proteínas, derivada de las características y formas de suministro de la fuente de NNP utilizada, siendo esto resultan coincidente con las empleadas en el presente trabajo (urea de liberación controlada y urea convencional). En este caso, para el T1 (NNP-LC única toma) en las primeras horas post alimentación el volumen consumido no aporta la energía suficiente para capturar el N-NH<sub>3</sub> liberado de manera controlada siendo el total de la dosis lo que resulta infundido en el rumen. Esto queda evidenciado en la diferencia significativa observada en la concentración de N-NH<sub>3</sub> observada en la hora 1. No obstante, la cantidad de N-NH<sub>3</sub> por encima de la capacidad de los microorganismos para asimilarlo, es también responsable de las diferencias evidenciadas en los horarios de muestreo entre los tratamientos. La disponibilidad ruminal de N<sub>2</sub>, puede alterar los patrones de consumo, digestibilidad y parámetros ruminales como la concentraciones de AGV, N-NH<sub>3</sub> y pH ruminal (pH mayor a 7 incrementan la absorción) (Herrera-Saldana *et al.* 1990; Rodger, 2004) y se manifiesta en aumentos de los parámetros sanguíneos. Niveles de amoníaco en el rumen mayores a 50 - 80 mg/dl elevan el pH, la absorción de NH<sub>3</sub> y generan altos niveles de amoníaco en sangre; que pueden provocar una intoxicación (Stritzler y col, 1983). Aun así, en T1 donde las condiciones eran proclives a generar intoxicaciones (hora 1: N-NH<sub>3</sub> 80 mg/dl y pH 7,2) no se generaron estados adversos evidentes, siendo el período de exposición a esas concentraciones reducido. Los T3 (urea mezclada con la ración) y T2 (NNP-LC mezclada en la ración) en ningún momento presentaron condiciones proclives a intoxicaciones, sea porque no superaron los 80 mg/dl en la concentración de N-NH<sub>3</sub> o bien porque el pH se mantuvo siempre por debajo de 7. Además, las



concentraciones de N-NH<sub>3</sub> en el presente trabajo no elevaron el pH ruminal lo suficiente como para acelerar la absorción de éste a través del epitelio ruminal generando toxicidad. Esta ausencia de efecto tóxico en períodos breves de exposición a concentraciones de 80 mg/dl, como la ausencia de cambios en el pH ha sido reportado por diversos autores, mostrando que los presentes resultados son esperables (Satter y Slyter, 1974; Astibia y col., 1982; Rearte, 1992). En este trabajo como en el de Stritzler et.al, (1983), el pH ruminal solo habría favorecido el incremento en la absorción de N-NH<sub>3</sub> a través de las paredes del rumen en torno al momento de la ingesta, es decir inmediatamente antes y hasta la primera hora luego de la ingesta, donde el pH ruminal superó el valor de 7. Aun así, los valores promedios de pH no se vieron afectados por las fuentes o frecuencia de suministro; concordando con Slyter et. al. (1979) y Taylor-Edwards et al., (2009 b) quienes con dietas a base de silo de planta entera de maíz y suplementación con fuentes de NNP-LC y urea (rangos de 1,9-1,6% MS) tampoco encontraron variaciones en el pH ruminal. El rango de valores de pH ruminal encontrado, resultó superior a lo presentado por Hoover, (1986) y similares a los encontrados por Cardoso y col 2000; en ningún caso los valores de pH, fueron lo suficientemente bajos como para afectar la digestibilidad y la síntesis de proteína microbiana.

Considerando el tercer parámetro que caracteriza el ambiente ruminal, lo evidenciado en este trabajo en relación a la concentración de AGV, es que ni la fuente nitrogenada ni la frecuencia de dosificación generaron cambios en dicha concentración. Esto se diferencia de lo observado por algunos autores, que muestran cambios en la concentración de AGV habiendo utilizado dietas fibrosas pero distintas al ensilaje (Herrera-Saldana et al., 1990; Rodger, 2004) e incluso otros que han empleado dietas semejantes a las empleadas en el presente trabajo (Slyter, et.al.,1979; Owens, et al., 1986, Nocek; Tamminga, 1991; Lemosquet et al., 2004). Según estos autores, las diferencias en la producción de AGV conllevarían un cambio en la síntesis de proteína microbiana. Como se planteó anteriormente, en el presente trabajo los valores de concentración promedios de AGV totales, de ácido acético, propiónico y butírico, no evidenciaron diferencias entre tratamientos, como así tampoco en la relación acético: propiónico coincidiendo con lo presentado por Duque et al., (2009); Garret et al., (2005); Taylor-Edwards, et al., (2009 b), Galo et al., (2003) y Satter y Slyter,(1974) que trabajaron con dietas con diferentes niveles de suplementación y formas de liberación de NNP o reemplazando urea convencional por NNP-LC. Melgoza et al (2007), evaluaron diferentes tipos de recubrimientos para

alterar la liberación de nitrógeno y reportaron que la liberación *in vitro* de la urea protegida con polímero comienza a los 20 minutos de incubación y que la liberación del 100% del  $N_2$  se obtuvo a las 6.5 horas después de iniciada la prueba. Además los reportes de otros trabajos afirman que el recubrimiento del NNP-LC podría ser responsable de estar interfiriendo en la disponibilidad ruminal de nitrógeno, afectar la fermentación ruminal de nutrientes, impedir la total liberación de  $N_2$ , reducir la permanencia en rumen y aumentar la excreción fecal de la  $N_2$  (Oncuer et al., 1990; Taylor-Edwards et al., 2009 a). Si bien, en este trabajo, no se evaluó el tiempo de retención en rumen del NNP-LC, se observó la presencia de los polímeros de dicha fuente al momento de recolectar muestras de las cánulas duodenales, con lo cual podríamos esperar los efectos mencionados por estos autores. Aun así, por una parte la ausencia de diferencias entre tratamientos en la Digestibilidad *in vivo* media aparente, en el consumo de materia seca, en el pH ruminal y en la concentración promedio de  $N-NH_3$  estaría indicando que la cantidad total de  $N_2$  fue semejante para todos los tratamientos; mientras que por otra parte las diferencias en la concentración de  $N-NH_3$  a lo largo del día, mostraría un efecto de la frecuencia de suministro sobre su dinámica. Igualmente los resultados de Taylor- Edwards et al., (2009); Oltjen et al., (1968); Thopson et al., 1972; Owens et al., (1980) y Taylor-Edwards et al., (2009) demuestran que el NNP-LC tiene de hecho una velocidad más lenta de liberación del nitrógeno que la urea y puede reducir las concentraciones en el tiempo de  $N-NH_3$  pero mantener similares resultados en parámetros como concentración de AGV, pH ruminal, Digestibilidad y CMS. En nuestra investigación probablemente no hubo sincronización entre la velocidad con la que los carbohidratos se desdoblaron y la disponibilidad del nitrógeno degradable en el ambiente de fermentación para los dos tipos de fuentes (urea y NNP-LC). Por lo cual, se asume que existió un patrón de fermentación similar entre los tratamiento; que se refleja en la ausencia de diferencias en las concentraciones totales y en las proporciones de AGV entre tratamientos., razón por la cual no fueron encontradas diferencias en los parámetros de degradación.

Continuando con el impacto de la concentración de  $N-NH_3$ , además de analizarlo en el ambiente ruminal debe ser analizado en los parámetros sanguíneos. En este trabajo y al igual que en los trabajos de Chalupa, (1968); Beitz, (1995 b);Thompson et al., (1982); Orzechowski et al., (1987); Fernandez et al., (1988); Fernandez et al., (1990); Rearte, (1992); Beitz, (1995 c); LeeK, (1995); Bohnert et al., (2002b); Marini; Van Amburgh, (2003), Marini, et al., (2004); Huntington, et. al., (2006), el incremento de la disponibilidad de  $NH_3$  en rumen se correlacionó de forma positiva con la

concentración plasmática de urea. Tal lo esperado, las variaciones en las concentraciones de urea en plasma se evidenciaron post- alimentación. Estas variaciones están sujetas a las concentraciones de  $N-NH_3$ , reciclado de nitrógeno y asociadas a la frecuencia de suministro (Hersom, 2008; Cole; Todd, 2008). De esta forma la dosis única genera un pico máximo en T1 en la hora 4, luego de que en la hora 1 fuese máxima la concentración de  $N-NH_3$  en rumen. En este sentido, las diferencias observadas entre los tratamientos se condicen con lo presentado por Currier et.al., (2004 a) y Huntington et al.,( 2006) quienes demuestran que dependiendo de la frecuencia de provisión del suplemento de NNP se detectan variaciones en la concentración plasmática de la urea, alcanzando máximos a partir de la hora y retornando a valores normales pasada las cinco horas post suministro. En el presente trabajo en ningún momento se llegó a la saturación de las capacidades de absorción en rumen de  $N-NH_3$  y la detoxificación en hígado en forma de urea (Chalupa, 1968; Currier et al., 2004 b), dado que las concentraciones llegaron a valores normales siempre en un rango inferior a las 5 hs. El presente trabajo permite remarcar la importancia de la frecuencia en la dosificación, dado que los parámetros sanguíneos resultaron más estables en el tiempo cuando el nitrógeno no proteico fue entregado mezclado con la ración, llevando esto a que la ingesta del mismo fuese paulatina, respecto de la dinámica observada en el tratamiento de toma única.

Otra derivación de las concentraciones ruminales elevadas de  $N-NH_3$  es el aumento de la glucemia, aspecto evaluado por varios autores (Spires; Clark, 1979; Emmanuel; Edjtehadi, 1981; Emmanuel et al., 1982; Huntington, et al., 2006). El resultado de dichas investigaciones demuestra que se observan niveles más altos de glucosa en sangre, asociados a incrementos de la producción en hígado, a la desanimación y catabolismo de aminoácidos para la síntesis de glucosa (Chalupa 1968, Hoover et al., 1963, Huntington et al., 2006) y al aumento de secreción de glucagón para evitar la hipoglucemia sumado al ajuste en el uso de AG y cetonas para obtener energía (Bergman et al., 1974; Beitz 1995 b; Bergman, 1995 y Overton et al., 1999). El presente trabajo, concuerda con lo expresado por estos autores, dado que en los T1 y T3, al incrementarse la concentración de  $N-NH_3$ , se incrementó la urea en plasma y aunque los valores de glucosa no se diferenciaron, se encontraron cercanos a valores máximos de referencia observados en bóvidos (rango de referencia 0,4- 0,7 g /100ml) (Gagliostro, 1986; Bondi, 1988; Kamande, 2006). Al mismo tiempo, los valores elevados de la glucosa sanguínea estimulan la liberación de insulina y favorecen la incorporación de glucosa al tejido adiposo, estimula la re-esterificación de

ácidos grasos (AG) y reduce la actividad de la lipasa y también la liberación de AG libres en sangre, aumenta la concentración de triglicéridos y decrece la formación de cuerpos cetónicos. (Beitz. 1995 a; Beitz. 1995 b; Bergman, 1995). La relación de estas observaciones y las concentraciones de glucosa y triglicéridos en sangre de este trabajo, concuerda. Puesto que el tratamiento con Urea convencional (T3) se diferenció del resto presentando valores mínimos en concentraciones de triglicéridos en plasma ( $p= 0,024$ ) acompañado del menor valor de glucemia, en cambio los tratamientos T2 y T1 presentaron máximos valores de concentración de triglicéridos y los mayores valores en glucemia; con lo cual nos permite asumir que la fuente de NNP-LC independientemente de la forma con que se suministró es responsable de esta respuesta.

En vista de los resultados de las concentraciones de  $N-NH_3$ , las estrategias para mejorar la utilización de amoníaco para síntesis microbiana de proteína es la sincronización con fuentes energéticas, que incluye cambios en la cantidad, disponibilidad y degradabilidad de proteínas y carbohidratos (Lapierre; Lobley, 2001) e implica coexistencia y disponibilidad (Hersom, 2008). Los microorganismos pueden en el corto plazo sortear los efectos de asincronías entre fuentes energéticas y nitrogenadas reciclando el nitrógeno vía  $NH_3$  y urea (Firkins, 1996; Valkeners et al., 2004; Cabrita et al., 2006; Hersom, 2008). En el presente trabajo ni la forma de suministro ni el tipo de fuente de NNP generaron diferencias en la SPM, al igual que en los trabajos de Richardson et al., (2003); Reynolds; Kristensen, (2008). En cambio en otros trabajos se encontraron diferencias pero debidas a los altos requerimientos proteicos demandado por animales que además de NNP necesitaban aminoácidos provenientes de las proteínas del alimento (Tedeschi, *et al.*, 2002; Ludden et al., 2002 a; Ludden et al., 2002b; Valkeners et al., 2004; Valkeners et al., 2006; Britos et al., 2007; Marichal *et al.*, 2009; Taylor-Edwards, et al., 2009 a; Taylor-Edwards, *et al.*, 2009 b). Al mismo tiempo, Golombeski y col. (2006); Kononoff y col., (2006), concluyen que NNP-LC permitiría el aporte sostenido de nitrógeno a los microorganismos del rumen aumentando la eficiencia de utilización del amoníaco liberado, es decir la sincronización. Esto es así siempre que se acompañe con una fuente de carbohidratos que al desdoblarse acompañe el aporte de  $N_2$  (Duque et al., 2009; Galo et al 2003; Dewhurst et al., 2000). El presente trabajo concuerda en parte con estas afirmaciones, dado que los resultados ponen en evidencia que el aporte sostenido de N a los microorganismos del rumen y la estabilidad del ambiente ruminal para un uso eficiente del  $NH_3$  estaría asociado a la frecuencia de suministro de este

producto. Así se evidencia en T2 en el comportamiento más estable de las variables uremia y N-NH<sub>3</sub> ruminal, mostrando una menor dispersión entre el valor máximo y el mínimo. Puesto que en el T2 (NNP-LC mezclado con la ración) las concentraciones de amoníaco en el rumen se encontraron por encima del rango 5-23,5 mg/dl, asumiéndose entonces que se alcanzó el máximo en la síntesis de proteína microbiana (SPM) (Setter; Roffler, 1975). Si bien el rango expresado en la literatura para maximizar la tasa microbiana es muy amplio (Satter, Roffler, 1975), en el presente trabajo los niveles nunca fueron inferiores a 15 mg/dl, independientemente de la frecuencia de suministro o fuente de NNP, con lo cual se plantea que se ha alcanzado el máximo de síntesis de proteína en todos los casos. Los valores de SPM encontrados en el presente trabajo (90 y 230 g SPM por kg MO digerida) se encuentran dentro de los rangos propuestos por distintos autores (Bondi, 1988; Milton, et al., 1997). Siendo que no se observaron diferencias en la DivMS, ni en la SPM, se considera que ni el tipo de fuente nitrogenada ni la frecuencia de suministro generaron un ambiente ruminal limitante para el crecimiento bacteriano aspecto que puede ser reforzado en función de los presentado por distintos autores (Bunting et al., 1989 a\_y b; Bowen et al., 1998; Currier et al., 2004 b II).

## 6. CONCLUSIÓN

En el contexto del presente trabajo la utilización de NNP de liberación controlada en novillos que consumen ensilaje de maíz reunió evidencia suficiente para afirmar que:

- Atempera las asincronía entre la oferta de energía y nitrógeno a nivel ruminal en especial cuando es entregada en forma conjunta con la ración.
- La forma de suministro, incide en las concentraciones de parámetros ruminales y en las concentraciones de metabolitos en plasma.
- Cuando se incrementa la concentración de N-NH<sub>3</sub>, el metabolismo animal responde con incremento en la generación de urea, independientemente de los tratamientos estudiados.
- Las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> no habrían de elevar el pH lo suficiente como para acelerar la absorción de N-NH<sub>3</sub> a través del epitelio ruminal y generar toxicidad.
- La glucosa sanguínea se acercó al máximo observado en bóvidos, efecto que estimula el aumento en la concentración de triglicéridos en plasma.

Los resultados del presente trabajo sugieren que la utilización de NNP-LC como suplemento totalmente mezclado con el ensilaje de maíz, incrementa las concentraciones triglicéridos en plasma y permite mayor estabilidad en las concentraciones de N-NH<sub>3</sub> y uremia. Ello genera un ambiente ruminal más favorable, pero sin evidenciar diferencias en la digestibilidad *in vivo* de la ración y en la síntesis de proteína microbiana respecto de la urea convencional con igual frecuencia de suministro o NNP-LC suministrados en un pulso vía ruminal. Independientemente de la tipo de fuente y frecuencia de suministro, el NNP no repercutió en la DivMS, ni en los patrones de consumo como así tampoco en la SPM. Por lo tanto NNP-LC puede ser utilizado como suplemento de nitrógeno para modular la aparición de N<sub>2</sub> en el rumen y puede proporcionar resultados similares a los encontrados cuando se suplementa con urea sin el potencial riesgos asociados con esta.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- ALLTECH INC. 2008. Optigen-Nutrición y Salud Animal. [ en línea] <<http://www.alltech.com/es/pages/default-new.aspx>> [consulta: 24 junio 2008]
- AMMERMAN, C. B., G. L. VERDE, J. E. MOORE, W. C. BURNS, AND C. F. CHICCO. 1972. Biuret, urea and natural proteins as nitrogen supplements for low-quality roughage for sheep. *J. Anim. Sci.* 35:121–127.
- ANDRAE, J.G.; HUNT, C.W.; PRITCHARD, G.T.. 2001. Effect of hybrid, maturity, and mechanical processing of corn silage on intake and digestibility by beef cattle. *J. Anim. Sci.*,v.79, p.2268-2275.
- ARC. 1984. Agriculture Research Council. UK.
- ASTIBIA, O.R.; CANGIANO, C.A.; COCIMANO, M.R.; SANTINI, F.J. . 1982. Utilización del nitrógeno por el rumiante. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 4(4): 373-384.
- ATASOGLU, C.; VALDES, C.; NEWBOLD, C. J.; WALLACE, R. J. 1999. Influence of peptides and amino acids on fermentation rate and the novo synthesis of amino acids by mixed micro-organisms from the sheep rumen. *Br. J. Nutr.* 81:307–314.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M.D.. 2005 a. A three- step in vitro procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. *J. Anim. Sci.*, 73, 1459-1465.
- BACH, A.; CALSAMIGLIA, S.; STERN, M. D.. 2005 b. Nitrogen Metabolism in the Rumen. American Dairy Science Association. *J. Dairy Sci.* 88: 9-21.
- BACH, A.; YOON, I.K.; STERN, M.D.; JUNG, H.G.; CHESTER-JONES, H. 1999. Effects of type of carbohydrate supplementation to lush pasture on microbial fermentation in continuous culture. *J. Dairy Sci.* 82:153-160.
- BAUMGARDT, B.R. 1974. Food intake, energy balance and homeostasis. In the control of Metabolism. . Pennsylvania State University Press. J.D.Sink, Ed., pp.88-112.
- BEITZ, D. C.. 1995 a . Cap 25. Metabolismo de lípidos. In: Swenson M.J. y W.O. Reece. *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. Uteha Noriega Editores Mexico.pp. 453-472.
- BEITZ, D. C.. 1995 b. Cap 24 Metabolismo de carbohidratos.. In: Swenson M.J. y W.O. Reece. *Fisiología de los animales domésticos de Dukes*. Uteha Noriega Editores Mexico.pp.437-452.

- BEITZ, D. C.. 1995 c. Cap 26 Metabolismo de proteínas y aminoácidos. In: Swenson M.J. y W.O. Reece. Fisiología de los animales domésticos de Dukes. Uteha Noriega Editores Mexico.pp.473 -491.
- BERGMAN, E. N., BROCKMAN, R. P.; KAUFMAN, C. F..1974. Glucose metabolism in ruminants: Comparison of whole-body turnover with production by gut, liver, and kidneys. Fed. Proc. 33:1849-1854.
- BERGMAN, E.N..1995 .Cap 27 Trastornos del metabolismo de carbohidratos y grasas. In: Swenson M.J. y W.O. Reece. Fisiología de los animales domésticos de Dukes. Uteha Noriega Editores Mexico.pp.: 492-503.
- BODINE, T; PURVIS, H. . 2003. Effects of supplemental energy and/or degradable intake protein on performance, grazing behavior, intake, digestibility, and fecal and blood indices by beef steers grazed on dormant native tall grass prairie. J. Anim. Sci. 81: 304 – 317
- BOHNERT, D. W., SCHAUER, C. S.; DELCURTO, T.. 2002b. Influence of rumen protein degradability and supplementation frequency on performance and nitrogen use in ruminants consuming low quality forage: Cow performance and efficiency of nitrogen use in wethers. J. Anim. Sci. 80:1629–1637.
- BOHNERT, D. W., C. S. SCHAUER, M. L. BAUER, T. DELCURTO. 2002a. Influence of rumen protein degradability and supplementation frequency on steers consuming low-quality forage: I. Site of digestion and microbial efficiency. J. Anim. Sci. 80:2967–2977.
- BONDI, A. A. 1988. Nutrición animal: Metabolismo proteico de los rumiantes. Pg. 155-168.
- BOWEN, M., R. M. DIXON, A. WHITE, AND J. TERNOUTH. 1998. Rumen microbial synthesis in heifers fed low-quality hay and increasing levels of urea. Anim. Prod. Aust. 22:290.
- BRITOS DE ARAUJO, D.; WAHRMUND, J.; HERSOM, M.; ARTHINGTON, J.. 2007. Evaluation of Optigen II® as a Source of Rumen Degradable Protein for Mature Beef Cows. Florida Beef Report. Pg 61-63.
- BUNTING, L. D.; BOLING, J. A.; MACKOWN, C. T.; DAVENPORT, G. M.. 1989 a. Effect of dietary protein level on nitrogen metabolism in the growing bovine: II. Diffusion into and utilization of endogenous urea nitrogen in the rumen. J. Anim. Sci. 67:820–826.



- BUNTING, L.D.; BOLING, J.A.; MACKOWN, C.T. 1989 b. Effect of dietary protein level on nitrogen metabolism in the growing bovine: I. Nitrogen recycling and intestinal protein supply in calves. *J. Anim. Sci.* 67: 810-819.
- CABRITA, A. R. J.; DEWHURST, R. J.; ABREU, J. M. F.; FONSECA, A. J. M.. 2006. Evaluation of the effects of synchronizing the availability of N and energy on rumen function and production responses of dairy cows a review. *Anim. Res.* 55:1–24.
- CAIRNIE, A. . 1981. Recent advances in animal nutrition in Australia. pp. 74-81.
- CARDOSO, R.C., VALADARES FILHO, S.C., COELHO DA SILVA, J.F., PAULINO, M.F., VALADARES, R.F.D., CECON, P.R., COSTA, M.A.L., OLIVEIRA, R.V.. 2000. Síntese microbiana, pH e concentração de amônia ruminal e balanço de compostos nitrogenados, em novilhos F1 Limousin x Nelore. *Rev. Bras. Zootec.* 29, 1844–1852
- CECAVA, M.J.; MERCHEN, N.R.; BERGER, L.L.; FAHEY, G. C. Jr. . 1988. Effects of dietary energy level and protein source on site of digestion and duodenal nitrogen and en amino acid flows in steers. *J.Anim.Sci.* 66:961-974.
- CHALUPA, W. . 1968. Problems in feeding urea to ruminants. *J. Anim. Sci.* 27:207–219
- CHURCH, D. . 1974. *Fisiología digestiva y nutrición de los rumiantes*. Edit. Acribia, Zaragoza. España. 544p.
- CHURCH, D. Y.; POND, W. G. 1977. *Bases científicas para la nutrición de los animales domésticos*. Edit. Acribia. Zaragoza. España. 462p.
- CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. . 1992. Microbial protein synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 75:2304–2323..
- CLARK, J. H.; DAVIS, C. L. . 1983. Future improvement of milk production: Potential for nutritional improvement. *J. Anim.Sci.* 57:750–764.
- COCHRAN, R. C.; ADAMS D. C.; WALLACE, J. D.; GALYEAN M. L.. 1986. Predicting digestibility of different diets with internal markers: Evaluation of four potential markers. *J. Anim. Sci.* 63: 1476 -1483.
- COLE, N. A.; TODD, R. W.. 2008. Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in concentrate-fed ruminants. *J. Anim. Sci.* 86: E318-E333.

- CONRAD, H. R.; PRATT, A. D.; HIBBS, J. W.. 1964. Regulation of feed intake in dairy cows. 1. Changes in the importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. *J. Dairy Sci.* 47:54-62.
- CUNHA DE OLIVEIRA JUNIOR, R.; VAZ PIRES, A.; SUSIN, I.; DE RESENDE FERNANDES, J. J. E PORTELA SANTOS, F. A. 2004. Digestibilidade de nutrientes em dietas de bovinos contendo uréia ou amiréia em substituição ao farelo desoja. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 39: 2 - 8.
- CURRIER, T. A., BOHNERT, D. W.; FALCK, S. J.; SCHAUER, C. S.; BARTLE, S. J.. 2004 b. Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: III. Effects on ruminal fermentation characteristics in steers. *J. Anim. Sci.* 82:1528–1535.
- CURRIER, T. A., BOHNERT, D. W.; FALCK, S. J.; SCHAUER, C. S.; BARTLE, S. J.. 2004 b. Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: II. Effects on site of digestion and microbial efficiency in steers. *J. Anim. Sci.* 2004. 82:1508–1517
- CURRIER, T. A.; BOHNERT, D. W.; FALCK S. J.; BARTLE, S. J. 2004 a. Daily and alternate day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: I. Effects on cow performance and the efficiency of nitrogen use in wethers. *J Anim. Sci.*, 82:1508-1517.
- DE LEÓN GODOY S.; CHICCO, C. F.. 1991b. Suplementación de bovinos alimentados con forraje de pobre calidad con fuentes de proteínas de diferentes tasas de degradación ruminal. *Zoot. Tropical.* 9:131-144.
- DI LORENZO, N. AND DI CONSTANZO, A. 2007. In vitro release of ammonia nitrogen from various nitrogen sources in batch culture. *Journal of Animal Science* 85, Suppl.2: N138.
- DI MARCO O.N.; AELLO, M.S. . 2002. ¿Afecta el exceso de amonio ruminal el gasto energético de rumiantes? [En línea] Unidad Integrada Balcarce (Fac. Cs. Agrarias, UN de Mar del Plata/ INTA, Estación experimental agropecuaria Balcarce.) <<http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/bovinos/nutrición/amonio.htm>> [consulta junio 2009].
- DI MARCO O.N.; AELLO, M.S.; ARIAS, S.. 2005. Digestibility and ruminal digestion kinetics of corn silage. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.2, p.223-228,. Universidad Nacional de Mar del Plata, Facultad de Ciencias Agrarias – EEA INTA Balcarce. CC 276 (7620) Balcarce, BA, Argentina.

- DI MARCO, O.N.; AELLO, M.S.; NOMDEDEU, M. . 2002 Effect of maize crop maturity on silage chemical composition and digestibility (in vivo, in situ and in vitro). *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.99, p.37-43.
- DISCHE, Z. 1962. *Methods Carbohydr. Chem.* 1: 477-514.
- DEHORITY, B. A. . 2003. Rumen Microbiology. Cap 14. Additional metabolic activities and interactions among rumen microorganisms. Pp: 321-357.
- DEWHURST R J, DAVUES D R AND MERRY R J 2000 Microbial protein supply from the rumen. *Animal Feed Science and Technology* 85:1-21
- DOLEY, P. T., T. CASSON, L. CRANSBERG AND J. B. ROWE. 1994. Faecal output of grazing sheep measured by total collection or using chromium sesquioxide. *Small Ruminant Research.* 13:231 - 236.
- DUQUE, M.; NOGUERA, R. R.; RESTREPO, L. F..2009. Efecto de la adición de urea protegida y sin protección sobre la cinética de degradación *in vitro* del pasto estrella (*Cynodon nlemfluensis*) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Livestock Research for Rural Development Volume 21, Art58. [en línea]* <http://www.lrrd.org/lrrd21/4/duqu21058.htm> [consultado: September 20, 2011]
- EGAN, A. R. 1965. Nutritional status and intake regulation in sheep. II. The influence of sustained duodenal infusions of casein or urea upon voluntary intake of low-protein roughages by sheep. *Aust. J. Agric. Res.* 16:451–462.
- ELIZALDE, J.C.; SANTINI F , J .1992 Factores nutricionales que limitan las ganancias de peso en bovinos en el periodo otoño-invierno. Boletín técnico N° 104. INTA E.E.A. Balcarce.
- ELIZALDE, J.C.; CREMIN, J.D.; FAULKNER Jr. D.B.; MERCHEN, N.R.. 1998. Performance and digestion by steers grazing tall fescue and supplemented with energy and protein. *J. Anim. Sci.* 76: 1691.
- ELIZALDE, J.C.; MERCHEN, N.R.; FAULKNER, D.B. . 1999. Supplemental cracked corn for steers fed fresh alfalfa: II. Protein and amino acid digestion. *J. Anim. Sci.* 77: 467.
- EMERICK, R. 1993. Intoxicaciones por nitrato y urea. En: Church, C. (ed). *El rumiante, fisiología digestiva y nutrición.* Zaragoza, Acribia, p. 553-558.
- EMMANUEL, B.; EDJTEHADI, M. . 1981. Glucose biokinetics in normal and urea-treated sheep (*Ovis aries*). *Comp. Biochem. Physiol.* 68B, 555–560.
- EMMANUEL, B.; THOMPSON, J.R.; CHRISTOPHERSON, R.J.; MULLIGAN, L.P.; BERZINS, R. . 1982. Interrelationships between urea, ammonia, glucose, insulin

- and adrenaline during ammonia-urea toxicosis in sheep (*Ovis aries*). *Comp. Biochem. Physiol. A* 72: 697–702.
- ESCALONA, R.; RAMÍREZ, P.; BARZAGA, G.; DELA CRUZ B.; MAURENIS, C. 2007. Intoxicación por urea en rumiantes. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de Granma. 4p.
- FERNANDEZ, J. M.; CROOM JR. W. J.; TATE JR. L. P.; JOHNSON, A. D., 1990. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on hepatic and portal-drained visceral flux of metabolites and regulatory hormones. *J. Anim. Sci.* 68:1726–1742.
- FERNANDEZ, J.M.; CROOM JR.,W.J.; JOHNSON, A.D.; JAQUETTE, R.D.; EDENS, F.W., 1988. Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on blood metabolite and regulatory hormone concentrations. *J. Anim. Sci.* 66: 3259–3266
- FERNANDEZ, H. H.; GALLI, J; VILLAR EZCURRA, J.; GALLEANO, A.. 1992. Software para la alimentación de bovinos de carne. Unidad Integrada Balcarce Curso Programa Reqnov 2008. Pag 1-47.
- FERRELL, C. L., K. K. KREIKEMEIER, AND H. C. FREETLY. 1999. The effect of supplemental energy, nitrogen, and protein on feed intake, digestibility, and nitrogen flux across the gut and liver in sheep fed low-quality forage. *J. Anim. Sci.* 77:3353–3364.
- FIRKINS, J. L. . 1996. Maximizing microbial protein synthesis in the rumen. *J.Nutr.* 126: 1347S-1354S.
- FORBES, J. M. 1992. Metabolic aspects of satiety. *Proc. Nutr. Soc.*5:13–19.
- FORBES, J. M. . 2007. A personal view of how ruminant animals control their intake and choice of food: minimal total discomfort. *Nutr. Res. Rev.* 20:132-146.
- GAGLIOSTRO, G.A. 1986. Utilización de metabolitos plasmáticos en la apreciación del estado nutricional en ruminantes. *Revision Bibliográfica. Rev. Arg. Prod Animal.* Vol 6 n 3-4: 139-150.
- GALO E, EMANUELE S H, SNIFFEN C AND WHITE KNAPP J R 2003 Effects of polymer-coated urea product on nitrogen metabolism in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 86 (6):2154 – 2162.
- GALYEAN, L. M.. 1997. Laboratory procedures in animal nutrition research. Cap XI. The Use of Indigestible Markers in Nutrition Studies .pp:122-126.
- GARCIA, S. C.. 1996. Suplementación de forraje fresco con granos de maíz y cebada. Sitios de digestión y síntesis de proteína microbiana. Tesis de Magister

- Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina pp. 49.
- GARRETT, J.; MILLER-WEBSTER, T.; HOOVER, W.; SNIFFEN, C.; PUTNAM, D..2005. Encapsulated slow release urea in lactating dairy cow diets impacts microbial efficiency and metabolism in continuous culture. *J. Anim. Sci.* 83(Suppl. 1):321 (Abstr.)
- GARRIZ M.; LÓPEZ, A.. 2002. Suplementación con nitrógeno no proteico en rumiantes Monografía .Universidad Nacional de Río Cuarto. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Consulta 12 julio de 2008.Disponible en: <http://produccionbovina.com/>.
- GODDEN, S. S. 2001. Milk Urea Nitrogen Testing. Vol. . No. 2. Ontario DHI fact finder,41-006-98.[Online]<http://www.westerndairyscience.com/html/WDDigest/>
- GOLOMBESKI, G.L.; KALSCHEUR, K.F.; HIPPEN, A.R.; SCHINGOETHE, D.J. 2006. Slow release urea and highly fermentable sugars in diets fed to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, vol. 89, p. 4395-4403.
- GREGORINI, P.. 2011. Estado interno. Estímulos que motivan el consume y ciertas conductas ingestivas de ruminantes en pastoreo. En: Cangiano , C.A.; Brizuela, M. A.. 2011. (Ed). Producción animal en pastoreo. Ediciones INTA. pp. 291-320.
- GUADA, J.A.. 1993. Efectos del procesado sobre la degradabilidad ruminal de proteína y almidón. IX Curso de especialización FEDNA. Dpto. de Prod. Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria de Zaragoza. BARCELONA, 08-09 Noviembre. pp. 1-14.[en línea] <<http://www1.etsia.upm.es/fedna/capitulos/93CAP-2.pdf>>[consulta: 10 septiembre 2009].
- HALL, M. B., HUNTINGTON, G. B.. 2008. Nutrient synchrony: Sound in theory, elusive in practice. *J. Anim. Sci.* 86: E 287- E 292.
- HELMER, L.G., BARTLEY, E.E. 1971. Progress in the utilization of urea as a protein replacer for ruminants. *J Dairy Sci.*, vol. 54, 25-51.
- HELMER, L.G.; BARTLEY, E.E.; DEYOE, C.W. 1970. Feed processing. VI. Comparison of Starea, urea, and soybean meal as protein sources for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, vol: 53, p. 883-887.
- HERRERA-SALDANA, R. ; HUBER, J. T. . 1989. Influence of varying protein and starch degradabilities on performance of lacting cows. *J.Dairy Sci.* 72:1477.
- HERRERA-SALDANA, R.; GOMEZ-ALARCON, R.; TORABI, M.; HUBER, J. T.. 1990. Influence of synchronizing protein and starch degradation in the rumen on nutrient utilization and microbial protein synthesis. *J. Dairy Sci.* 73:142–148.

- HERSOM, M. J. . 2008. Opportunities to enhance performance and efficiency through nutrient synchrony in forage-fed ruminants. *J. anim. Sci.* 86: E306-E317.
- HODGSON, J., ILLUS, A.W. 1982. *The Ecology and Management of Grazing Systems*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 159–184.
- HOOVER, W. H., KESLER, E. M.; FLIDSE, R. J.. 1963. Carbon sources for in vitro protein synthesis by rumen bacteria. *J. Dairy Sci.* 46:733.
- HOOVER, W. H.; STOKES, S. R.. 1991. Balancing carbohydrates and protein for optimum rumen microbial yield. *J. Dairy Sci.* 74:3630-3644.
- HOOVER, W.H., 1986. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. *J. Dairy Sci.* 69, 2755–2766.
- HORNECK, D.A.; MILLER, R.O. 1998. Determination of total nitrogen in plant tissue. In: Kalra, Y.P. ed. *Handbook of reference methods for plant analysis*. CRC Press. Pp 75-83.
- HUBER, J. 1975. Protein and non-protein nitrogen utilization in practical dairy rations. *J. Anim. Sci.* 41: 954-961.
- HUHTANEN, P.; RINNE, M.; NOUSIAINEN, J.. 2007. Evaluation of the factors affecting silage intake of dairy cows: A revision of the relative silage dry-matter intake index. *Animal* 1:758–770.
- HUME, I.D.; BIRD, P. R.. 1970 a. Synthesis of microbial protein in the rumen. I. Influence of the level of nitrogen intake. *Aust. J.Agric. Res.* 21:283-296.
- HUME, I.D.; BIRD, P. R.. 1970 b. Synthesis of microbial protein in the rumen: IV. The influence of the level and form of dietary sulfur. *Aust. J. Agric. Res.* 21:315-322.
- HUME, I.D., MOIR, R. J.; SOMERS, M.. 1970. Synthesis of microbial protein in the Rumen, I. Influence of the level of nitrogen intake. *Aust. J. Agric. Res.* 21 (2): 283-96.
- HUNTINGTON, G. H. 1997. Starch utilization by ruminants; from basics to the bunk. *J. Anim. Sci.* 75:852.
- HUNTINGTON, G.B.; HARMON, D.L.; KRISTENSEN, N.B.; HANSON, K.C.; SPEARS, J.W.. 2006. Effects of a slow-release urea source on absorption of ammonia and endogenous production of urea by cattle. *Animal Feed Science and Technology* 130: 225–241
- KAMANDE, G.M.. 2006. Digestión ruminal y nutrición. Congreso de forrajes. *Producir XXI, Bs. As.*, 15(180):52-57.

- KASWARI, T.; LEBZIEN, P.; FLACHOWSKY, G.; MEULEN, U.. 2007. Studies on the relationship between the synchronization index and the microbial protein synthesis in the rumen of dairy cows. *Anim. Feed Sci. and Tec.*, vol 139: 1–22.
- KENNEDY, P. M., AND L. P. MILLIGAN. 1980. The degradation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants. *Can. J. Anim. Sci.* 60:205.
- KNIGHT W. M. and OWENS F.N.1973. Yntreval urea infusion for lambs. *J. Anim. Sci.* 36:145.
- KONONOFF, P.J.; HEINRICHS, A.J.; GABLER, M.T. . 2006. The effects of nitrogen and forage source on feed efficiency and structural growth of prepubertal holstein heifers. *The Professional Animal Scientist*, vol. 22, p. 84-88.
- KOTB, A. R. AND T. D. LUCKEY. 1972. Markers in nutrition. *Nutrition abstracts and reviews.* 42: 813 - 845.
- LAPIERRE, H.; LOBLEY, G. E..2001. Nitrogen recycling in the ruminant: A review. *J. Dairy Sci.* 84(Suppl. E):E223–E236.
- LEEK, B. F. . 1995 .Cap 21. Digestión en el estomago de los ruminates. In: Swenson M.J. y W.O. Reece. *Fisiología de los animales domesticos de Dukes.* Uteha Noriega Editores Mexico.pp. 387-417.
- LE MOSQUET, S.; RIGOUT, S.; BACH, A.; RULQUIN, H.; BLUM, W., 2004. Glucose metabolism in lactating cows in response to isoenergetic infusions of propionic acid or duodenal glucose. *J. Dairy Sci.*, 87, 1767-1777.
- LENG, R.A. . 1990. Factors affecting the utilization of “poor-quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. *Nutr. Res. Rev.* 3, 277–303.
- LORENZATTI, P.J.; SANTINI, F.J.; PAVAN, E.; VILLARREAL, E. L.; DEPETRIS, G.J.2004. Efecto de la sustitución de la harina de girasol por urea en dietas en engorde a corral .*Revista Argentina de Producción Animal.* Vol. 24- Supl. 1
- LUDDEN, P. A.; WECHTER, T. L.; HESS, B. W.. 2002a. Effects of oscillating dietary protein on nutrient digestibility, nitrogen metabolism, and gastrointestinal organ mass in sheep. *J. Anim. Sci.* 80:3021–3026.
- LUDDEN, P. A.; WECHTER T. L.; HESS, B. W.. 2002b. Effects of oscillating dietary protein on ruminal fermentation and site and extent of nutrient digestion in sheep. *J. Anim. Sci.* 80:3336–3346.
- MACHADO NOGUEIRA FILHO, J.C.; CAMILO VALINOTE, A.; GARCIA HERRERA, R. A.; LEME, P. R. 2005. Optigen® and Beef-sacc® in ammonia release and liquid kinetics on the rumen of water buffaloes fed high roughage diets. *BIOTAM.* 2: 20-22.

- MACRAE, J.E.; ARMSTRONG, D.G. 1968. Enzyme method for determination of alpha-linked glucose polymers in biological materials. *J. Sci. Food Agric.* 19: 578-581.
- MARICHAL, M. J.; TRUJILLO, A.I.; GUERRA, M.H.; CARRIQUIURY, M.; PIAGGIO, L. 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. Vol XIII N° 2 pg. 52 - 59
- MARINI, J. C.; KLEIN, J. D.; SANDS J. M.; VAN AMBURGH M. E.. 2004. Effect of nitrogen intake on nitrogen recycling and urea transporter abundance in lambs. *J. Anim. Sci.*, 82:1157-1164.
- MARINI, J. C.; VAN AMBURGH M. E..2003. Nitrogen metabolism and recycling in Holstein heifers. *J. Anim. Sci.* 81:545:552.
- MARTINEFSKI J.; RECAVARREN,P.. 2005. Prácticas ganaderas - Experimentación en campos de productores INTA. EEA Balcarce, Olavarría, B. Juárez, Laprida y Gral. La Madrid. Argentina. Material de divulgación, pag 86.
- MARTÍNEZ MARÍN, A. . 2009. Slow release urea as substitute for plant protein in diets for ruminants REDVET. *Revista electrónica de Veterinaria.* ISSN: 1695-7504.Vol. 10, N° 12.
- MAYNARD, L. A. . 1984. *Nutrición Animal.* Mc Graw Hill. Séptima edición. México. pp.175
- MC COLLUM III, T. 1997. Supplementation strategies for beef cattle. [en línea] <http://agpublications.tamu.edu/pubs/eanim/b6067.pdf>. [consulta: Octubre 15, 2008].
- MC MANEY, M.. 2004. Silaje de maíz de planta entera. *Producir XXI*, Bs.As., 12 (156): 47:49.
- MEHREZ, A.Z.; ORSKOV, E.R.; MCDONAL, Y. 1977. Rates of rumen fermentation in relation to ammonia concentration. *Br. J. Nutr.* 38:437-443.
- MELGOZA L M, ROCHA A, PLATA P F, GERMÁN M Y SANDOVAL T H 2007 Recubrimiento pelicular de comprimidos matriciales de alta densidad y pellets para la liberación modificada de urea en rumiantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* [en línea], 38 (004).
- MILTON, C. T.; BRANDT, JR R. T.; TITGEMEYER, E. C.. 1997.Urea in dry-rolled corn diets: finishing steer performance, nutrient digestion, and microbial protein production. *J Anim Sci.* 75:1415-1424.



- MILTON, C.; BRANDT, R. 1994(b). Level of urea in high grain diets: nutrient digestibility, microbial protein production and rumen metabolism (Abst.). J. Anim. Sci. 72(1): 354
- MOIR, R. J.; HARRIS, L.E.. 1962. Ruminant flora studies in the sheep. X. Influence of nitrogen intake upon ruminal function. J. Nutr. 77:285.
- MOORE, J; BRANT, M; KUNKLE, W; HOPKINS, D. 1999. Effects of supplementation on voluntary forage intake, diet digestibility, and animal performance, J. Anim. Sci. 77, Suppl. 2 :122-135
- MORAN, J.; PRITCHARD, K. 1987. Maize for fodder. Technical Report series N° 146.
- MOULD, F. L.; ORSKOV, E.R 1983. Manipulation of rumen fluid pH and its influence on cellulolysis in sacco, dry matter degradation and the rumen microflora of shepp offered either hay or concentrate. Anim. Feed Sci. Technol.10, 1-14.
- NOCEK J.E.; TAMMINGA S., 1991. Site of digestion of starch in the gastrointestinal tract of dairy cows and its effects on milk and composition. J. Dairy Sci. 74: 3598-3629.
- NOCEK, J.E.; RUSSELL, J.B.. 1988. 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.
- NOLAN, J.V.; LENG, R.A. 1972. Dynamic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep. Br. J. Nutr. 27:177-194.
- NOMDEDEU, M.; DI MARCO, O.N. 2001. Digestibilidad in vivo e in vitro y composición química del silaje de maíz en tres estados de madurez. Av. Prod. Anim., v.26, p.119-127.
- NRC. 1996. Nutrient requirements of beef cattle. 7th ed. National Academy Press, Washington, DC.
- OBISPO, E.. 2005. EL uso de las fuentes de nitrógeno no proteico en rumiantes. Revista Digital CENIAP HOY N° 8, Maracay, Aragua, Venezuela. URL [www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n8/arti/obispo\\_n/obispo\\_n.htm](http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n8/arti/obispo_n/obispo_n.htm), Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, UCV, Maracay.
- ONCUER, A.; MILNE, J. S.; WHITELAW, F. G.. 1990. The effect of hindgut fermentation on urea metabolism in sheep nourished by intragastric infusion. Exp. Physiol. 75:689–700.
- ØRSKOV, E. R. 1976. Factores que influncian la utilización del nitrógeno proteico y el no proteico (NNP) en rumiantes jóvenes. Producción Animal Tropical. 3: 95-102.

- ØRSKOV, E.R.. 1982. Rumen microorganisms and their nutrition. In Protein Nutrition in Ruminants London: Academic Press. ER Ørskov, Ed., Pp.:19–40.
- ØRSKOV, E. R.. 1988. Dinámica del nitrógeno en el rumen. Nutrición proteica de los ruminantes. Acribia S.A. (eds). Zaragoza. España. Pp 45-94
- ØRSKOV, E. R.; MACLEOD, N. A.; KYLE, J..1986. Flow of nitrogen from the rumen and abomasum in cattle and sheep given protein free nutrients by intragastric infusion. Br. J. Nutr. 56:241-248.
- ORZECZOWSKI, A.; MOTYL, T.; PIERZYNOWSKI, G.; BAREJ, W. . 1987. Hepatic capacity for ammonia removal in sheep. Zentralbl. Veterinarmed. A 34, 108–112.
- OVERTON, T. R., J. K. DRACKLEY, C. J. OTTERMANN-ABBAMONTE, A.D. BEAULIEU, L. S. EMMERT, AND J. H. CLARK. 1999. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. J. Anim. Sci. 77:1940–1951.
- OWENS, D.; MCGEE, M.; BOLAND, T.; O'KIELY, P.. 2009. Rumen fermentation, microbial protein synthesis, and nutrient flow to the omasum in cattle offered corn silage, grass silage, or whole-crop wheat. J Anim Sci .87:658-668.
- OWENS, F. N.; BERGEN, W. G. . 1983. Nitrogen metabolism of ruminant animals: Historical perspective, current understanding and future implications. J. Anim. Sci. 57:498-518.
- OWENS, F.N.; ZINN R.A.; KIM, Y.K., 1986. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. J. Anim. Sci. 63:1634-1648.
- PAYNE, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriological
- PEREIRA, D. H.; GOMES PEREIRA, O.; DA SILVA, B. C.; LEÃO, M. I.; DE CAMPOS VALADARES FILHO, S.C.; MARTINS CHIZZOTTI, F. H.; GARCIA, R.. 2007. Intake total and partial digestibility of nutrients, ruminal pH and ammonia concentration and microbial efficiency in beef cattle fed with diets containing sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) silage and concentrate in different ratios. Livestock Sci. 107: 53:61.
- PETIT H. V.; FLIPOT P. M..1992. Source and feeding level of nitrogen on growth and carcass characteristics of beef steers fed grass as hay or silage J Anim. Sci., 70:867-875.
- PHIPPS, R. 1978. Utilization of maize silage for milk production. Agricultural Research Council, London. 263-295.

- PILGRIM, A. F., GRAY, F.V., WELLER, R.A.; BELLING, C.B. 1970. Synthesis of microbial protein from ammonia in the sheep's rumen and the proportion of dietary nitrogen converted into microbial nitrogen. *Brit. J. Nutr.* 24:589.
- PLEGGE, S.D.; BERGER, L.L., FAHEY, G. C. Jr.. 1983. Performance of growing and finishing steers fed roasted soybean meal. *J. Anim. Sci.* 57:1372
- PLUMMER, J.; MILES, J.; MONTGOMERY, J. 1971. Effect of urea in the concentrate mixture on intake and production of cows fed corn silage as the only forage. *J. Dairy Sci.* 54: 1861-1865.
- PRESTON, T.R.; LENG, R.. 1986. Supplementation of diets based in fibrous residues and by products. Elsevier Press. Amsterdam. pp. 373-413.
- PRESTON, T.R.; LENG, R. A. 1989. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles: Aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre nutrición de rumiantes en el trópico. Consultorías para el Desarrollo Rural Integrado en el Trópico (CONDRIT). Ltda. Cali, Colombia. Pp.312.
- PRESTON, T.; LENG, R. A. . 1990. Ajustando los sistemas de producción pecuaria a los recursos disponibles: aspectos básicos y aplicados del nuevo enfoque sobre nutrición de rumiantes en el trópico. Segunda edición. CONDRIT, Cali, Colombia. Pag. 312.
- PUCHALA, R.; KULASEK, G. W.. 1992. Estimation of microbial protein flow from the rumen of shepp using microbial nucleic acids and urinary excretion of purine derivates. *Canadian Journal of Animal Science.* 72, 821-830.
- REARTE, D. 1992. Alimentación y calidad de leche. *Revista Nuestro Holando.* Abril de 1992. 34-45.
- REARTE, D.H.. 1995. Ensilado de grano húmedo.II Simposio lechero de Tandil. Ed.Sopena Hnos. p. 59-62.
- RELLING, A. E.; MATTIOLI, G. A.. 2003. Fisiología Digestiva y Metabólica de los Rumiantes. Editorial EDULP (Ediciones 2002 y 2003) Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias U.N.L.P. pp. 23-64.
- REPETTO, J.; CAJARVILLE, C.; CURBELO, A.;SAPRIZA, D. 2003. Suplementos. Cursoa distancia sobre nutrición de rumiantes. Montevideo, Facultad de Veterinaria. Modulo 4, 155 p.
- REYNOLDS, C. K.; KRISTENSEN N. B..2008. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *J. Anim. Sci.* 86(E. Suppl.):E293–E305

- RICHARDSON, J. M.; WILKINSON, R. G.; SINCLAIR, L. A.. 2003. Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy source and their effects on the growth and metabolism of lambs. *J. Anim. Sci.* 81:1332–1347.
- RODGER, A.. 2004. Fermentación ruminal, degradación proteica y sincronización energía-proteína en terneras en engorde intensivo. Tesis Doctoral. Uni. Autónoma de Barcelona. pag 39- 49 y 89-208.
- ROFFLER, R.E.; SATTER, L.D.. 1975. Relationship between ruminal ammonia and nonprotein nitrogen utilization by ruminants. II. Application of published evidence to the development of a theoretical model for predicting nonprotein nitrogen utilization. *J. Dairy Sci.*, vol. 58, p. 1889-1898.
- ROGERS, J.A.; CONRAD, H.R.; DEHORITY, B.A.; GRUBB, J.A. 1986. Microbial numbers, rumen fermentation and nitrogen utilization of steers using wet and dried brewers grains. *J. Dairy Sci.* 59:745-753.
- ROVIRA, P.. 2014. Suplementación de bovinos con grano húmedo de sorgo y fuentes proteicas sobre campo natural. Unidad de comunicación y transferencia INIA Montevideo. Uruguay. Serie técnica N°12 p. 1-24.
- RUSSELL, J. B.. 1998 Strategies that ruminal bacteria use to handle excess carbohydrate. *J. Anim. Sci.*, 76:1955-1963
- RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G; VAN SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J.. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: I. Ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.*, vol. 70, p. 3551-361.
- SAS. 2009. SAS/STAT® User's guide (Release 9.1). SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- SATTER L. D.; WU, Z.; MOREIRA, V.R.; BAL, M.A.; SHAVER, R.D.. 1999. Processing corn silage. *Proc. MN Forage Council Annual Mtg. Rochester, MN.* p. 35-42.
- SATTER, L.; ROFFLER, R. 1975. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 58: 1219-1237.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L.. 1974. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. Nutrition institute, ARS, USDA, Beltsville, Maryland, USA. *Br J. Nutr.* vol. 32, p. 199-208.
- SCHROEDER, G.F., ELIZALDE, J.C.; FAY J.P.. 2000. Caracterización del valor nutritivo de los silajes de maíz producidos en la provincia de Buenos Aires. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 20 (3-4): pp. 161-177.
- SEO, J. K., YANG, J., KIM, H. J., UPADHAYA, S. D., CHO, W.; JONG K. H.. 2010. Effects of Synchronization of Carbohydrate and Protein Supply on Ruminal

- Fermentation, Nitrogen Metabolism and Microbial Protein Synthesis in Holstein Steers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, p:151-741.
- SICILIANO-JONES ; ST. PIERRE. 1997. Using in situ data in ration formulation. Tri State Nutrition Conference. New York: FARME Institute. [en línea] <<http://www.farme.com/assets/articles/Altech>> short course- balancing w in situ data.htm.>[consulta: 10 septiembre 2009].
- SMITH, R. H. 1969. Nitrogen metabolism and the rumen. *J. Dairy Res.*36: 313-331.
- SLYTER L.L., SATTER, L.D.; DIRIUS, D.A.. 1979. Efect of ruminal ammonia concentration on nitrogen utilization by steers. *J. Ani. Sci.* Vol 48, N° 4.
- SOTO, C.; REINOSO, V.. 2007. Suplementación proteica en ganado de carne *Rev. Soc. Vet. del Uruguay (Montevideo)* 42(167):27-34.
- SPIRES, H.R., CLARK, J.H., 1979. Effect of intraruminal urea administration on glucose metabolism in dairy steers. *J. Nutr.* 109, 1438–1447.
- STEEN, R. W. J.; GORDON, F. J.; DAWSON, L. E. R.; PARK, R. S.; MAYNE, C. S.; AGNEW, R. E.; KILPATRICK, D. J.; PORTER, M. G. . 1998. Factors affecting the intake of grass silage by cattle and prediction of silage intake. *Anim. Sci.* 66:115–127.
- STOCK, R.; MERCHEN, N.R.; KLOPFENSTEIN, T.; POOS, M.. 1981. Feeding value of slowly degraded proteins. *J. Anim. Sci.* 53:1109.
- STRITZLER, N.; GALLARDO, M.; GINGINS, M. 1983. Suplementación nitrogenada en forrajes de baja calidad. *Rev. Arg. Prod. Anim.* Vol. 3, N°4, 283-309.
- SYMONDS, H. W .. 1981 The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia. . *Br. J. Nutri.* , 46, 481.
- TAYLOR-EDWARDS, C. C.; ELAM, N. A.; KITTS, S. E.; MCLEOD, K. R.; AXE, D. E.; VANZANT, E. S.; KRISTENSEN N. B.; HARMON, D. L. . 2009 b. Influence of slow-release urea on nitrogen balance and portal-drained visceral nutrient flux in beef steers. *J. Anim. Sci.*, 2009.87:209-221.
- TAYLOR-EDWARDS, C. C.; HIBBARD, G.; KITTS, S. E.; MCLEOD, K. R.; AXE, D.E.; VANZANT, E. S.; KRISTENSEN, N. B.; HARMON, D. L..2009 a. Effects of slow-release urea on ruminal digesta characteristics and growth performance in beef steers. *J. Anim. Sci.* 87:200–208.
- TEDESCHI, L. O.; BAKER, M. J.; KETCHEN, D. J.; FOX, D. G.. 2002. Performance of growing and finishing cattle supplemented with a slow-release urea product and urea. *Can. J. Anim. Sci.*82:567–573

- THOMAS, E.; TRENKLE, A.; BURROUGHS, W.. 1979. Evaluation of productive agents applied to soybean meal and fed to cattle. Laboratory measurements. *J. Anim. Sci.* 49:1337
- THOMPSON, W. R.; BOLSEN, K. K.; ILG, H. J.. 1982. Mixtures of Corn Grain and Corn Silage, Nitrogen Source and Zeranol for Feeder Lambs. *J. Anim. Sci.*, 55:211-217.
- TOPPS, J.H.; ELLIOTT, R.C.. 1965. Relationship between concentrations of ruminal nucleic acids and excretion of purine derivatives by sheep. *Nature (Lond.)*, 205, 498-499.
- VALKENERS D., THÉWIS A., AMANT S.; BECKERS Y. 2006. Effect of various levels of imbalance between energy and nitrogen release in the rumen on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscle Belgian Blue bulls fed a corn silage-based diet. *J. Anim. Sci.*, 84:877-885.
- VALKENERS, D.; THÉWIS, A.; PIRON, F.; BECKERS, Y.. 2004. Effect of imbalance between energy and nitrogen supplies on microbial protein synthesis and nitrogen metabolism in growing double-muscle Belgian Blue bulls. *J. Anim. Sci.* 82:1818–1825.
- VAN SOEST, P. V. J..1994. *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Edition Cornell University Press, USA. Pages: 230-311.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B. AND LEWIS, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74: 3583-3597.
- WISEK, W.J.. 1984. Ammonia: its effects on biological systems, metabolic hormones, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 1984; 67:481-98.
- VOLDEN, H.; VELLE, W.; HARSTAD, O. M.; AULIE, A.; SJAASTAD, Ø. V..1998. Apparent ruminal degradation and rumen escape of lysine, methionine, and threonine administered intraruminally in mixtures to high-yielding cows. *J. Anim. Sci.* vol 76:p.1232–1240.
- WALDO, D. R. 1968. Symposium: Nitrogen utilization by the ruminants. Nitrogen metabolism in the ruminants. *J. Dairy Sci.* 51 :265-275.
- WALEY, W.; MORAN, J.; FARREL, D. 1993. Growing out feeder steers and finishing feedlot cattle on systems incorporating maize silage (Abst.). *Recent advances in animal nutrition in Australia 1993.* 97:106.
- WEAKLEY, D. C.; OWENS, F. N.. 1983. Influence of Ammonia Concentration on Microbial Protein Synthesis in the Rumen *Anim. Sci. Research Report* 39- 44.

- WILSON, G.; MARTZ, F.; CAMPBELL, Y.; BECKER, B. 1975. Evaluation of factors responsible for reduced voluntary intake of urea diets for ruminants. *J. Anim. Sci.* 41: 1431-1437.
- YANG, C. M.; RUSSELL, J. B. . 1992. Resistance of proline-containing peptides to ruminal degradation in vitro. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3954-3958.
- ZINN R. A.; OWENS, F. N.. 1986.A rapid procedure for purine measurement and its use for estimating net ruminal protein synthesis. *Can. J. Anim. Sci.* 66: 157-166.