



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
GANADERÍA**

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE MICROCAPSULAS DE UREA
In Vitro PARA SU USO EN RUMIANTES**

RAYMUNDO LIRA CASAS

T E S I S

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

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2011

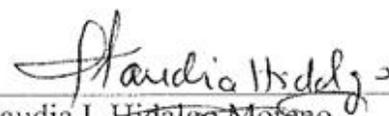
La presente tesis titulada: “**Diseño y evaluación de microcápsulas de urea *in vitro* para su uso en rumiantes**”, realizada por el alumno: “**Raymundo Lira Casas**”, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

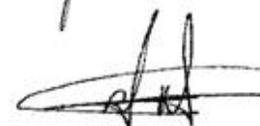
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD, GANADERÍA

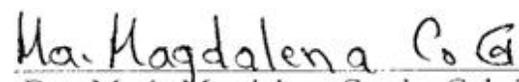
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO 
Dr. J. Efrén Ramírez Bribiesca

Asesor 
Dra. Claudia L. Hidalgo Moreno

Asesor 
Dra. Elizabeth García García

Asesor 
Mc. Rosy G. Cruz Monterrosa

Asesor 
Dra. María Magdalena Crosby Galván

Montecillo, Texcoco, México, 15 de Mayo de 2011

DISEÑO Y EVALUACIÓN DE MICROCAPSULAS DE UREA *In Vitro* PARA SU USO EN RUMIANTES

Raymundo Lira Casas, MC.

Colegio de Posgraduados, 2011

Las nuevas líneas de investigación en nutrición de rumiantes están buscando diseñar productos con liberación prolongada de urea dentro del rumen. El objetivo de esta investigación fue desarrollar y evaluar microcápsulas que liberen urea en el líquido ruminal. Métodos: Las microcápsulas fueron preparadas por el método de emulsión y evaporación de solvente, como primer paso se preparo el acarreador poroso, después se preparo la fase orgánica con Eudragit RS 100 y por último se preparo la fase acuosa en donde fue agregada la fase orgánica. Las microcápsulas se identificaron mediante microscopia electrónica de barrido, determinando el tamaño y la morfología. Se evaluó la encapsulación de la urea, la flotabilidad de las microcápsulas y la liberación de N amoniacal en líquido ruminal. Resultados: Se encontraron diferencias significativas en el factor volumen de la fase acuosa en el nivel 50 mL ($p < 0.05$) y presento un efecto negativo en la encapsulación de la urea. La morfología de las microcápsulas fue mejor con el factor bajo de temperatura de la fase acuosa of 35 °C ($p < 0.05$), comparada con el nivel alto de 45°C. La flotabilidad de las microcápsulas fue arriba del 50% a las 12 h de agitación, mostrando diferencias significativas en el factor volumen de la fase orgánica de 20 mL ($p < 0.05$). Con las microcápsulas, la liberación de del N amoniacal incremento aun después de las 24 h en el líquido ruminal. El tratamiento con urea sin proteger después de una hora, la concentración de N amoniacal en líquido ruminal incremento rápidamente y entre las 12 y las 24 h declino la concentración. Conclusión: En la elaboración de las microcápsulas el volumen de la fase acuosa regula el porcentaje de encapsulación de la urea, debido a que es muy soluble en agua. El Eudragit RS 100 funcionó bien, encapsulando y manteniendo la lenta liberación de urea que se requiere en una digestión *in vitro* que simula las condiciones del rumen.

Palabras clave: Urea, microcápsulas, lenta liberación, rumiante.

DESIGNING AND EVALUATION OF UREA MICROCAPSULES *In Vitro* TO USE IN RUMINANTS

Raymundo Lira Casas, MC.
Colegio de Posgraduados, 2011

The new research lines in ruminant nutrition are working to design urea products of prolonged release within the rumen. The objective of this research was to develop and evaluate microcapsules that release urea in the rumen fluid. Methods: The microcapsules were prepared by the method of emulsion and solvent evaporation. First, the porous carrier was prepared; then the organic phase was prepared with Eudragit RS 100; and finally, the aqueous phase, in which the organic phase was added, was prepared. The microcapsules were identified through scanning electron microscopy, determining their size and morphology. Urea encapsulation, buoyancy of the microcapsules, and release of ammonia N in the rumen fluid were evaluated. Results: there were significant differences in the volume factor of the aqueous phase at 50 mL ($p < 0.05$), and there was a negative effect on the encapsulation of the urea. The morphology of the microcapsules was better ($p < 0.05$) with the low temperature factor of the aqueous phase at 35°C than with the high one, 45°C. The buoyancy of the microcapsules was above 50% at 12h of agitation, showing significant differences in the volume factor of the organic phase of 20 mL ($p < 0.05$). With regard to the microcapsules, the release of ammonia N increased even after 24 h in the rumen fluid. In the treatment with unprotected urea after an hour, the concentration of ammonia N in rumen fluid increased rapidly, but between 12 and 24h the concentration declined. Conclusion: In the preparation of the microcapsules the volume of the aqueous phase regulates the percentage of urea encapsulation, because it is very soluble in water. Eudragit RS 100 worked well, encapsulating and maintaining the slow release of urea that is required for *in vitro* digestion simulating conditions in the rumen.

Key words: Urea, microcapsules, slow release, ruminant.

Agradecimientos

Al consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por apoyar a la ciencia en México y permitir concluir mis estudios de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados y al programa de Ganadería por darme la oportunidad de obtener el grado de Maestro en ciencias.

Al Dr. Efrén Ramírez Bribiesca, por la confianza y apoyo que me brinda en mi formación profesional.

Al Dr. Ricardo Bárcena, por el apoyo que me ha brindado.

A la Dra. Claudia Hidalgo Moreno, por su incondicional ayuda en el laboratorio de Fertilidad de Suelos, del área de Edafología, en el Colegio de Postgraduado, Campus Montecillo.

A la Mc. Greta Hanaco Rosas Saíto, por su gran apoyo en el laboratorio de Microscopia en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

A la Dra. Elizabeth García García, a la Dra. Raquel López Arellano, a la Q.F.B. Rosario Juárez Andrade, por el apoyo incondicional en el laboratorio de Farmacia en La Facultad de Estudios superiores Cuautitlán Campo 4, de la Universidad Autónoma de México.

A la Dra. María Magdalena Crosby por la valiosa ayuda en el laboratorio de nutrición del Colegio de Postgraduados, Campus montecillo.

Al Dr. Gustavo Ramírez Valverde, y a la Mc. Rosy Gabriela Cruz Monterrosa, por su contribución, asesoramiento en la realización de la presente investigación.

Agradezco a todas esas personas que durante todo este tiempo de investigación, aportaron un poquito de su tiempo y experiencia en mí.

Dedicatoria

Agradezco a Dios y a la vida por la salud, por lo que soy y por lo que tengo.

A mis padres Raymundo Lira Ortiz e Irene Casas Rodríguez, por todo el apoyo, cariño y confianza que me dan.

A mis Hermanas, por su tiempo, apoyo y consejos.

Delia Lira Casas,

Noma Angélica Lira Casas

Belén Lira Casas.

A mi abuelo Carlos Casas Ávila, que en donde quiera que estés, aun tengo grabadas esas palabras que me alientan para seguir adelante.

A Mariana Sánchez Roldan, por toda la confianza, felicidad y amor que me das.

A todas las personas que en el andar de la vida he conocido, que me motivan y bendicen. ¡Gracias!

Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos

Aristóteles

CONTENIDO

	Pag.
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Planteamiento del problema.....	2
2. Objetivos	3
2. 1. Objetivo general.....	3
2. 2. Objetivos especificos	3
3. Hipotesis.	3
4. Marco teórico	4
4. 1. Características físicas de la urea	4
4. 2. Ciclo de la urea en el rumiante	4
4. 3. Amoniac en el rumen	6
4. 4. Intoxicación por amonio	6
4. 5. Microorganismos ruminales asociados al metabolismo de nitrógeno	7
4. 6. Nanotecnología y micropartículas	9
4.7. Productos con urea de lenta liberación	9
5. Literatura citada	10
CAPITULO I. Pruebas iniciales en la elaboración y caracterización de las microcápsulas.....	14
1. 1. Introducción	15
1. 2. Materiales y métodos	16
1. 2. 1. Pruebas de solubilidad de urea en etanol	16
1. 2. 2. Elaboración de microcapsulas.....	16
1. 2. 3. Observación de las microcapsulas en el microscopio electronico de barrido.....	17
1. 2. 4. Materiales.....	18
1. 3. Resultados	18
1. 3. 1. Pruebas de solubilidad de urea en etanol	18
1. 3. 2. Morfología	19
1. 4. Discusión	23

	Pag.
1. 5. Conclusiones	23
1. 6. Literatura citada	24
CAPITULO II. Diseño y evaluación de microcápsulas de urea <i>in vitro</i> en líquido ruminal.....	25
2.1. Introducción	26
2.2. Materiales y métodos	27
2. 2. 1. Preparación de las microcápsulas	27
2. 2. 2. Características de las microcapsulas	28
2. 2. 3. Observación de la morfología y tamaño de las microcápsulas en el microscopio electrónico de barrido	28
2. 2. 4. Determinación de la cantidad de urea dentro de las microcápsulas	28
2. 2. 5. Evaluación de la flotabilidad de las microcápsulas	29
2. 2. 6. Liberación <i>in vitro</i> de nitrógeno amoniacal de las microcápsulas en líquido ruminal	29
2. 2. 7. Diseño experimental	30
2.3. Resultados	30
2. 3. 1. Formación de las microcápsulas flotantes	30
2. 3. 2. Urea encapsulada	31
2. 3. 3. Flotabilidad de las microcápsulas	32
2. 3. 4. Cinética de liberación <i>in vitro</i> de nitrógeno amoniacal de las microcápsulas	33
2. 4. Discusión	34
2. 5. Conclusiones	35
2. 6. Literatura citada	36
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES	38
3. 1. Conclusiones	38
3. 2. Recomendaciones	38

ÍNDICE DE CUADROS

Pag.

Cuadro 1. Tratamientos para la elaboración de microcápsulas como pruebas iniciales.....	17
Cuadro 2. Resultados de la prueba de solubilidad en Etanol. +, ++, +++, grados de solubilidad.....	18
Cuadro 3. Evaluación de la morfología de las microcápsulas por el método <i>Effect Screening</i> con el programa JMP).....	30
Cuadro 4. Evaluación de la encapsulación de urea por el método <i>Effect Screening</i> con el programa JMP).....	32
Cuadro 5. Distribución de los 250 mg del N utilizado en el proceso elaboración de las microcápsulas).....	32
Cuadro 6. Evaluación de la flotabilidad de las microcápsulas por el método <i>Effect Screening</i> con el programa JMP).....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Posible mecanismo de interdependencia nutricional en tres especies de bacterias ruminales, adaptada de (Ferrera-Cerrato y Alarcon, 2007).	8
Figura 2. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 1, elaboradas con 200 ml de fase acuosa a 40 °C y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica. .	19
Figura 3. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 2, elaboradas con 200 ml de fase acuosa a 30 °C y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica.	20
Figura 4. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 3, elaboradas con 200 ml de fase acuosa con 500 mg de Silicato de calcio y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica. .	21
Figura 5. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 4, elaboradas con 40 ml de fase acuosa, 300 mg de silicato de calcio y con la proporción de diclorometano-etanol 2:1 en la fase orgánica. .	21
Figura 6. Micrografía electrónica de barrido con microcápsulas que corresponden a la técnica 5, elaboradas con 50 mL de fase acuosa y con la proporción etanol-diclorometano 1:2 en la fase orgánica. .	22
Figura 7. Micrografía electrónica de barrido con microcápsulas amorfas que corresponden a la técnica 6, elaboradas con 50 ml de fase acuosa y solo con diclorometano en la fase orgánica. .	22
Figura 8. A y B) Microcápsulas con Carbón activado T° 35°C ,C) y D) Microcápsulas con Silicato de Calcio T° 35 °C. .	31
Figura 9. E) y F) Microcápsulas con Carbón activado T° 35 °C, G) y H) Microcápsulas con Silicato de Calcio T° 35 °C. .	31
Figura 10. Cinética de liberación de N amoniacal de las microcápsulas <i>in vitro</i> en líquido ruminal.	33

*Esta tesis fue financiada por el Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión no. 167304,
Para el Establecimiento y Operación de los Fondos para la Investigación Científica y Desarrollo
Tecnológico del Centro Público Colegio de Postgraduados, convocatorias 2009
Y por la
Línea 16, Innovación Tecnológica del Colegio de Postgraduados*

INODUCCIÓN GENERAL

Los rumiantes son animales eficientes en la degradación de alimentos fibrosos, durante su evolución, en su tracto digestivo se desarrollaron los compartimientos de fermentación conocida como retículo-rumen. En estos órganos se forma un microambiente que almacena alimentos y alberga microorganismos anaerobios, tales como: hongos, protozoarios y bacterias (Lee and Chiba, 2009). En los últimos años de investigación en nutrición de rumiantes, las bacterias han adquirido importancia debido a que tienen mayor actividad en la degradación de carbohidratos fibrosos, además de ser quienes producen proteína de alto valor biológico que es utilizada por el huésped. Las bacterias del rumen requieren amoníaco para la formación de aminoácidos, esta fuente de N se puede obtener de alimentos a base de granos o forraje, pero también de fuentes de nitrógeno no proteínico (NNP) como la urea (NRC, 2001; Galo *et al.*, 2003).

La proteína es uno de los tres nutrientes limitantes y caros en la elaboración de alimentos (Tillman y Sidhu, 1969). Por eso, su uso debe de ser eficiente, esto conduce a utilizar fuentes alternativas de N sin descuidar la calidad y sanidad de los productos de origen animal. Las bacterias pueden producir aminoácidos a partir de fuentes de N más económico como la urea. (Arelovich *et al.*, 2000). Esta es ampliamente usada en la alimentación de rumiantes como una fuente de NNP, la cual aumenta la producción de proteína bacteriana y mejora la degradación de alimentos fibrosos (Arelovich *et al.*, 2000; NRC, 2001). Por la fácil degradación, cuando se abusa del uso de esta fuente de N, se producen elevadas cantidades de amoníaco, que las bacterias no son capaces de utilizar al 100 % y las paredes del rumen absorben todo ese exceso de NH_3 o NH_4 dependiendo del pH ruminal (Abdoun *et al.*, 2007), para conducirlo al torrente sanguíneo, provocando una intoxicación a los animales, e incluso puede causarles la muerte (Bartley *et al.*, 1976; Bartley *et al.*, 1881).

Evitar la rápida transformación de la urea en amoníaco, es un punto clave en la investigación de rumiantes, buscando propiciar la mejor eficiencia en la utilización de N por las bacterias (Galo *et al.* 2003). Lo cual se puede reflejar en la actividad microbiana y la eficiencia de la producción de proteína bacteriana en el rumen. Por otro lado se han proporcionado diversos productos que brinden una lenta liberación de NNP en la alimentación de los rumiantes, tales como: biuret, fosfato diamónico, polifosfato amónico (Currier *et al.*, 2004; Lines y Weiss, 1996), Optigen 1200® (Duque

et al., 2009; Mc Vey y Laurenson., 2004), comprimidos matriciales recubiertos y pellets con películas de polímeros Surelease® (Melgoza *et al.*, 2007); pero aún no se han obtenido resultados relevantes. Por este motivo, se busca hacer un producto que eventualmente tenga la capacidad de mantener una liberación prolongada de NNP, con el fin de proveer N amoniacal constantemente a las bacterias y evitar intoxicaciones por mal uso de la urea (Arelovich *et al.*, 2000). El propósito de esta investigación fue elaborar y evaluar microcápsulas con urea, que mantengan una prolongada liberación de N, en pruebas *in vitro* con líquido ruminal.

1.- Planteamiento del problema

El NNP en forma de urea puede ser utilizado más eficientemente en dietas para rumiantes como una fuente de N para los microorganismos del rumen, el empleo de la urea es limitante debido a que los microorganismos del rumen la transforman rápidamente en amoniaco (Galo *et al.*, 2003), ocasionando que la cantidad de N amoniacal aprovechado por las bacterias sea bajo y a su vez gran proporción sea absorbido por las paredes del rumen hacia el torrente sanguíneo (Satter y Roffler, 1975; Abdoun *et al.*, 2007). Cuando el N amoniacal aumenta demasiado en el torrente sanguíneo, puede causar efectos adversos que oscilan desde reducir el consumo y desarrollo del animal, hasta provocar la muerte por intoxicación amoniacal (Bartley *et al.* 1981).

Las dietas con límites máximos de urea causan pérdidas potencialmente elevadas de N y energía. En este caso se ha considerado que un producto que mantenga una liberación prolongada de urea, sostiene los niveles considerables de amoniaco en el rumen, convirtiéndose en una posible opción para aumentar la proporción de urea destinada a la síntesis de aminoácidos por parte de las bacterias y reducir los riesgos de intoxicación (Bartley *et al.*, 1981). Actualmente en el mercado farmacéutico existen diversos polímeros entre ellos los acrilatos, como el Eudragit RS 100 (Kılıçarslan y Baykara, 2003), que sostienen una liberación prolongada de fármacos, por lo que es posible transferir la técnica de emulsión y evaporación de solvente (Kumar *et al.*, 2005), para la fabricación de microcápsulas y evaluar la lenta liberación en técnicas *in vitro* con líquido ruminal.

2. Objetivos

2. 1. Objetivo general

Elaborar y evaluar un producto que mantenga una prolongada liberación de urea *in vitro* en líquido ruminal.

2. 2. Objetivos específicos

1. Evaluar el método de emulsión y evaporación de solvente en la elaboración de microcápsulas con urea.
2. Evaluar la morfología, la encapsulación y flotabilidad de las microcápsulas
3. Evaluar la liberación de urea de las microcápsulas de Silicato de calcio y de Carbón activado *in vitro* en líquido ruminal.

3. Hipótesis

Con el método de emulsión y evaporación de solvente se pueden elaborar microcápsulas que mantengan una prolongada liberación de urea en líquido ruminal.

4. Marco teórico

4. 1. Características físicas de la urea

La urea $\text{CO}(\text{NH}_4)_2$, es una pequeña molécula orgánica sumamente soluble y no tóxica, la molécula de la urea está compuesta por C, H y N (Kroes y Reiss, 1989), esta molécula se encuentra en el líquido ruminal, sangre, leche, saliva, orina y otros fluidos corporales debido a que este es un producto terminal del metabolismo de las proteínas y circula en el organismo (Harmeyer y Martens, 1980). Industrialmente se produce urea en forma granulada de color blanco, que se usa como fertilizante en la agricultura (Rabindra *et al.*, 2002), de igual forma se emplea en las dietas para rumiantes como fuente de NNP, que es aprovechada por las bacterias del rumen para sintetizar proteína microbiana. La urea es una fuente de NNP de menor costo en comparación con la proteína vegetal, de la cual las bacterias usan principalmente el amoníaco para la formación de sus aminoácidos (Males y Purser, 1970), Por lo tanto, es conveniente usar estas fuentes en proporciones adecuadas para tener la mejor eficiencia en el uso del N.

4. 2. Ciclo de la urea en el rumiante

Los organismos excretan el N que es producto del metabolismo de los aminoácidos o del consumo de NNP. Los rumiantes y demás mamíferos, para excretar el amonio primero lo transforman en el hígado a moléculas de urea, debido a que son moléculas no tóxicas que pueden circular por el torrente sanguíneo (Haussingue, 1990). En el caso de las aves y reptiles, el N lo excretan en forma de ácido úrico (Miranda, 2006) y los peces excretan el amonio como tal (Felskie *et al.*, 1998); quedando clasificados como, urotélicos, uricotélicos y amonotélicos, respectivamente (Miranda, 2006).

El ciclo de la urea es un proceso metabólico, que sirve para formar urea a partir de amoníaco, posteriormente se elimina a través de la orina y en parte se recicla (Huntington y Archibeque, 1999); En los rumiantes, la urea por medio de la saliva llega nuevamente al rumen (Ibarra-González *et al.*, 2010). El amonio se produce por la desaminación, y en el caso de los rumiantes con ayuda de los microorganismos del rumen producen amonio y amoníaco por el contenido de NNP en el alimento,

absorbiéndose a través de las paredes de rumen (Abdoun *et al.*, 2007). El amonio y el amoniaco son toxinas que son acarreadas hacia el torrente sanguíneo para ser transportadas al hígado, más específicamente a los hepatocitos, ahí actúan los procesos enzimáticos para sintetizar moléculas de urea, que después son conducidas al torrente sanguíneo y dirigida a los riñones para ser excretada (Mian y Lee, 2002). En el caso de los rumiantes, la urea se recicla y nuevamente vuelve a estar disponible en el rumen para las bacterias, las glándulas salivales se encargan de extraer la urea del torrente sanguíneo y la secretan en la saliva (Reynolds y Kristensen, 2008). La toxicidad del amonio y el amoniaco se debe a la falta de transformación a moléculas de urea para poder ser desechado, ocasionando graves intoxicaciones e incluso la muerte del ganado (Bartley *et al.*, 1881).

El ciclo de la urea, descubierto por Krebs-Henseleit en 1932, es una vía metabólica donde el organismo transforma los metanolitos tóxicos derivados de las proteínas. Los metabolitos se pueden incorporar en diferentes niveles del ciclo y finalmente son transformados, desechados o reciclados (Haussinger, 1990). En los hepatocitos se lleva a cabo una serie de reacciones enzimáticas que corresponden a este ciclo. Las reacciones principales son 5, de las cuales dos son mitocondriales y tres citosólicas (Martín-Hernández, 2005, Krebs, 1942). La formación de carbamoilfosfato es la primera reacción mitocondrial que se lleva a cabo, consiste en la unión del amonio mas iones de bicarbonato, con uso de energía proveniente de dos moléculas de ATP, esta reacción se efectúa por la enzima llamada *Carbamoil Fosfato Sintetasa*, que depende de iones de magnesio como cofactor y es dependiente de N-acetilglutamato funcionando como activador alosterico, que forma hasta el 25 % de la proteína que hay en la mitocondria (Krebs *et al.*, 1978). La siguiente reacción es cuando el carbamoil-fosfato cede el grupo carbamoil a la ornitina, con ayuda de la enzima *Ornitina Transcarboxilasa* y como resultado queda la citrulina que a la vez libera un Pi, esta reacción se lleva a cabo en la mitocondria y el resto del ciclo de la urea se da en el citoplasma, por lo que la citrulina es exportada al citoplasma (Krebs, 1942). La entrada del segundo átomo de N para formar la urea se incorpora en la tercera reacción del ciclo de la urea, cuando el grupo ureido de la citrulina se condensa con el grupo amino del aspartato produciendo arginosuccinato, por acción de la enzima *Arginosuccinato Sintetasa* (Husson *et al.*, 2003). La siguiente reacción es para producir arginina y fumarato a partir del arginosuccinato por acción de la enzima *Arginosuccinato Liasa* (Levillain *et al.*, 1996). Y la reacción final que es la transformación de la arginina en urea y ornitina por la enzima *Arginasa* (Krebs, 1942).El ciclo de la urea está vinculado con el ciclo del acido cítrico, para recuperar

energía. En el metabolismo de un aminoácido su parte amínica es degradada en el ciclo de la urea y su parte carboxílica en el Ciclo de Krebs (Martín-Hernández 2005; Krebs, 1942).

4. 3. Amoniaco en el rumen

El amoniaco generado en el rumen sigue diferentes rutas, tales como: la síntesis de proteína bacteriana o se conduce al torrente sanguíneo penetrando las paredes del rumen. Cuando el NNP es rápidamente convertido en amoniaco, es absorbido hacia el torrente sanguíneo de la vena porta, que conduce al hígado en donde es convertido a urea, pero en ciertas circunstancias cuando el consumo de NNP es mayor, la cantidad de amonio en sangre se incrementa y la conversión de amonio a urea por parte del hígado es insuficiente, provocándose la intoxicación con amonio (Bartley et al, 1976, Lapierre y Lobley, 2001).

El N que es absorbido en el epitelio del rumen bajo diferentes condiciones, se caracteriza por la absorción del amoniaco y amonio, pero también se sabe que se absorbe como urea. Para los dos primeros el transporte a través del epitelio del rumen es lipofílico, donde, a un pH superior a 7, la magnitud de NH_3 absorbido es lineal, mientras que con un pH menor de 6.5 predomina la absorción de NH_4 vía putativa de los canales de potasio en la membrana apical (Abdoun *et al.*, 2006). De igual manera se sabe que la urea se absorbe por simple difusión, es muy variable, ya que la entrada de urea aumenta por la fermentación, producción de CO_2 y producción de ácidos grasos volátiles (Gärtner *et al.*, 1961).

4. 4. Intoxicación por amonio.

La intoxicación por amonio sucede cuando el animal consume urea o sales de amonio y los niveles de N amoniaco en la sangre de la yugular son mayores de 0.53 mg/100 mL, en el rumen son valores de 66.4 mg/100 mL. La muerte por intoxicación se da después de superar la concentración de 0.8 mg / 100 mL (Bartley *et al.*, 1981). La intoxicación es común cuando una animal no está

adaptado, debido a la inhabilidad del hígado para desintoxicar el torrente sanguíneo, el amoniaco es proporcional un pH elevado en el rumen (Coombe *et al.*, 1960).

4. 5. Microorganismos ruminales asociados al metabolismo de nitrógeno

El rumen es la principal cámara de fermentación con ecosistemas anaerobios diversos en microbios, hasta hace tiempo se reportaron 24 géneros y 63 especies de bacterias (Yokoyama y Johnson, 1988), 30 géneros y 300 especies de protozoarios (Wiliam y Coleman, 1992) y 5 géneros de hongos (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007), actualmente con la identificación del ARN se estima que los géneros y especies son mas y están surgiendo nuevas reclasificaciones (Krause y Russell, 1996). Estos microorganismos proporcionan proteínas de alto valor biológico, las bacterias son la mayor población en el rumen que va de 10^{10} a la 10^{11} por mL de fluido ruminal, los protozoarios son de mediana población que va de 10^4 a 10^6 y los hongos con una población menor entre 10^3 y 10^5 (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

Las bacterias utilizan fuentes nitrogenadas para la síntesis de sus propias proteínas, y es necesario que estén en sincronía con los carbohidratos. Un ejemplo claro es la interdependencia alimenticia entre bacterias, en donde *B. Amilopilus* crece en un medio con almidón y NH_3 produciendo masa microbiana, cuando el almidón se termina, estas bacterias entran en un estado de autolisis, liberando aminoácidos de cadena ramificada que a la vez son utilizados por *M. elsdenii* para la formación de ácidos grasos de cadena ramificada (AGCR) y la síntesis de proteína microbiana, ya que es incapaz de formar aminoácidos a base NH_3 . El exceso de ácidos grasos producidos por *M. elsdenii*, son utilizados por *R. albus*, esta es una bacteria que demanda AGCR, para una adecuada degradación de celulosa a glucosa que queda disponible para este conjunto de bacterias que interactúan en el rumen (Miura *et al*, 1980). En la Figura 1, se resume un ejemplo de la actividad microbiana en tres especies de bacterias.

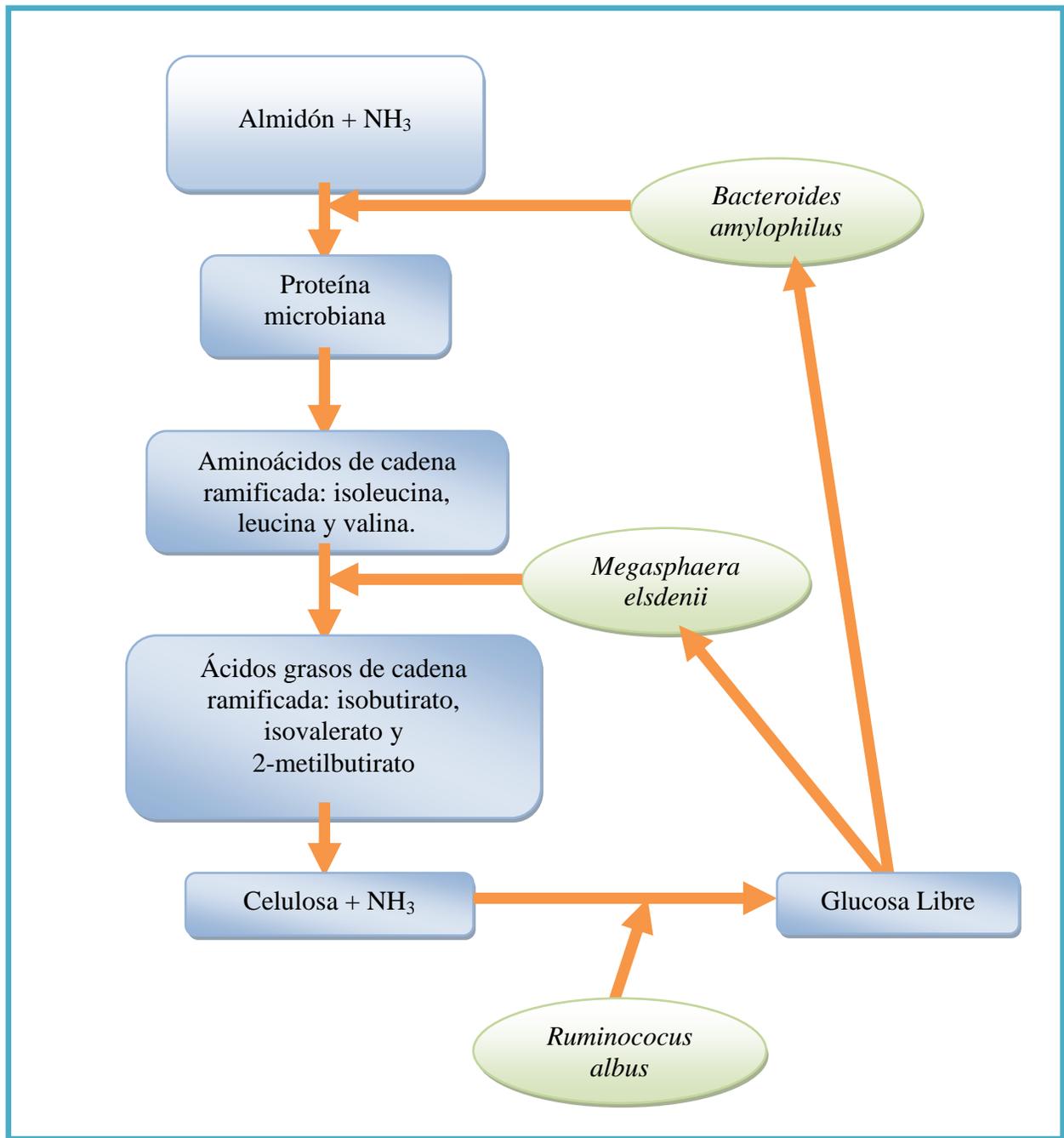


Figura 1. Posible mecanismo de interdependencia nutricional en tres especies de bacterias ruminales, adaptada de (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

4. 6. Nanotecnología y micropartículas

Nanotecnología es definida como el estudio y control de las dimensiones aproximadas entre 1-100 nanómetros de la materia. Para darnos idea, hay muchos materiales biológicos que entran en este grupo de mediciones, por ejemplo, los virus que miden de 10 a 200 nm, están en el intervalo superior de las nanopartículas, en el caso de las proteínas que miden de 4 a 50 nm, están en el intervalo inferior manométrico; los bloques moleculares de las proteínas son de 20 aminoácidos con un tamaño de 0.6 nm (Poole y Owens, 2003). Es un fenómeno que nos permite desarrollar nuevas aplicaciones en la investigación, en las últimas décadas la ingeniería de nanopartículas tiene que ser una clase de nuevos materiales con varias propiedades que tomen gran atractivo en el desarrollo comercial (Medina *et al.*, 2007). En el caso de las microcápsulas con tamaño entre 10 y 500 μm . el tamaño de las estructuras que se estudian o con las que se trabaja hace la diferencia. El tamaño es mayor, es comparable con estructuras como los cromosomas que miden entre 1.4 y 6 μm o las bacterias que son de orden microscópico o mesoscópico (Poole y Owens 2003).

4. 7. Productos con urea de lenta liberación.

4. 7. 1. Optigen 1200[®]

Este es un polímero que cubre al N ureico para suplementar a vacas lecheras. La difusión de urea a través de microporos en el polímero protector libera N en el rumen de ganado a bajas proporciones. El polímero que recubre es formado por una serie de reacciones que incluye urea, hexamethylene disocyanate trimer, resina alkyd, aceite tung. El resultado a través de la unión de poliéster poliuretano es resistente a la degradación de la fauna microbiana en el rumen. Aunque durante la digestión casi todo el N (93%) es removido del Optigen 1200[®] (Mc Vey y Laureson 2004: Löest *et al.*, 2001) aunque también en estudios de liberación de urea de este producto llega a su fin con el 100 % a las 6.5 h (Melgoza *et al.*, 2007).

4. 7. 2. Comprimidos matriciales nucleados y pellets recubiertos con Surelease®

Son comprimidos matriciales de urea y etilcelulosa, con núcleos de alta densidad Ba SO₄ y un recubrimiento pelicular de Surelease® con un tamaño de 30 a 60 µm, este producto controla la liberación de urea por 48 h, permaneciendo en el rumen por su densidad que tiene. En el caso de los pellets, se compararon con Optigen 1200® y mientras que los pellets de Optigen 1200® ya habían liberado el 100 % de urea a las 6.5 h, los pellets recubiertos con Surelease® solo habían liberado el 71% (Melgoza *et al.*, 2007).

4. 7. 3. Biuret

Contiene 41 % de N debido a que son dos moléculas de urea unidas menos un amoníaco, ésta se solubiliza más lentamente que la urea y por consiguiente se transforma con mayor lentitud en amoníaco, la desventaja es el menor contenido de N y es de mayor toxicidad tanto para las plantas como para los animales; posiblemente por el contenido de ácido cianurico. La urea para uso agrícola, se permite con una cantidad no mayor del 2% de biuret (Mikkelsen, 2007, Currier *et al.* 2004).

5. Literatura citada

- Abdoun K., F. Stumpff and H. Martens. 2007. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Animal Health Research*. 7: 43-54.
- Arelovich H. M., F. N. Owens, G. W. Horn and J. A. Vizcarra. 2000. Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation, forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea. *Journal Animal Science*. 78:2972-2979.
- Bartley E. E., A. D. Davidovich, G. W. Barr, G. W. Griffel, A. D. Dayton, C. W. Deyoe and R. M. Bechtle. 1976. Ammonia Toxicity in Cattle. I. Rumen and Blood Changes Associated with Toxicity and Treatment Methods. *Journal Animal Science*. 43: 835-841.

- Bartley. E. E., T. B. Avery, T. G. Nagaraja, B. R. Watt, A. Davidovich, S. Galitzer and B. Lassman, 1981. Ammonia toxicity in cattle. V. Ammonia concentration of lymph and portal, carotid and jugular blood after the ingestion of urea. *Journal Animal Science*. 53, 494–498.
- Coombe J. B., D. E. Tribe and J. W. C. Morrison. 1960. Some experimental observation on the toxicity of urea to sheep. *Australian Journal of Agricultural Research*. 11: 247-256.
- Currier T. A., D. W. Bohnert, S. J. Falck, C. S. Schauer and S. J. Bartle. 2004. Daily and alternate-day supplementation of urea or biuret to ruminants consuming low-quality forage: III. Effects on ruminal fermentation characteristics in steers. *Journal Animal Science*. 82:1528-1535.
- Duque M, R. R. Noguera and L. F. Restrepo. 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*. 21: Art. 58. <http://www.lrrd.org/lrrd21/4/duqu21058.htm>
- Felskie A. K., P. M. Anderson, and P. A. Wright. 1998. Expression and activity of carbamoyl phosphate synthetase III and ornithine urea cycle enzymes in various tissues of four fish species. *Com. Biochemistry Physiology* 119B (2) 355-364.
- Ferrera-Cerrato R. y A. Alarcón, 2007. *Microbiología Agrícola*. Hongos, bacterias, micro y macro control biológico y planta-microorganismo. Editorial Trillas.
- Galo E., S. M. Emanule, C. J. Sniffen, J. H. White and J. R. Knapp. 2003. Effects of a polymer-coated urea production nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle. *Journal Dairy Science*. 86:2154-2162.
- Gärtner K., Decker P. and H. Hill. 1961. Untersuchungen über die Passage von Harnstoff und Ammoniak durch die Pansenwand von Ziegen. *European Journal of Physiology*. 274: 281-288.
- Harmeyer I. J. and H. Martens. 1980. Aspects of urea metabolism in ruminants with Reference to the Goa. *Journal Dairy Science* 63:1707-1728.
- Haussinger. 1990. Nitrogen metabolism in liver: structural and functional organization and physiological relevance. A review article. *Biochemistry Journal*. 267:281-290.
- Huntington G. B. and S. L. Archibeque. 1999. Practical aspects of urea and ammonia metabolism in ruminants. *Journal of American Science*. 77: 1-11.
- Husson A., C. Brasse-Lagnel, A. Fairand, S. Renouf and A. Lavoinne. 2003. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline–NO cycle. Review article. *European Journal. Biochemistry*. 270, 1887–1899.

- Ibarra-González I., Fernández-Lainez C., Vela-Amieva M. 2010. Clinical and biochemical characteristics of patients with urea cycle disorders in a developing country. *Clinical Biochemistry*. <http://doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.12.004>.
- Kiliçarslan M and T. Baykara. 2003. The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres 252:99-109.
- Krebs H. A., Hems R., Lund P., Halliday D., Read W. W. C. 1978. Sources of ammonia for mammalian urea synthesis. *Biochemistry Journal*. 176,733-737.
- Krebs, H. A. 1942 Urea Formation in Mammalian Liver. *Klin Wschr* 36, 758-767
- Krebs, H. A., and Henseleit, K., 1932. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.*, 210, 33-46.
- Kroes L. R. and A. D. Reiss. 1989. Development of new techniques for the characterization of crystals and their growth solution. NASA Technical Memorandum NASA TM- 1003771.
- Kumar S. A., R. D. Nayanrao, S. Wadhwa. 2005. Floating microspheres of cimetidine: Formulation, characterization and in vitro evaluation. *Acta Pharmaceutica*. 55: 277-285.
- Lapierre H., G. E. and Lobley. 2001. Nitrogen Recycling in the Ruminant, a review. *Journal of Dairy Science* 84 (suppl. E): E223- E236.
- Lee I. Chiba 2009. Rumen microbiology and fermentation. *Animal Nutrition Handbook*. Section 3: Rumen Microbiology & Fermentation Page 55. References: Allison (1993) & Leek (1993) in "Dukes' Physiology of Domestic Animals" by Swenson & Reece, ed. (1993), <http://www.ag.auburn.edu/~chibale/an03microbiology.pdf>
- Levillain O., P. Parvy and A. Hus-Citharel. 1996. Arginine metabolism in cat kidney. *Journal of Physiology*. 49: 471-477.
- Lines and Weiss. 1996. Use of Nitrogen from Urea treated Alfalfa Hay, Urea, Soybean Meal, and Animal Protein Meal by Lactating Cows. *Journal Dairy Science*. 79: 1992-1999.
- Males J. R. and D. B. Purser. 1970. Relationship Between Rumen Ammonia Levels and the Microbial Population and Volatile Fatty Acid Proportions in Faunated and Defaunated Sheep. *American Society for Microbiology*. 19: 485-490.
- Martínez-Hernández I. 2005. Una aproximación a los desórdenes hereditarios del ciclo de la urea en el hombre. *Revista Biomédica*. 16, 193-206.
- Medina C., M. J. Santos-Martinez, A. Radomski, O. I. Corrigan and M. W. Radomski. 2007. Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. A review. *British Journal of Pharmacology* 150, 552–558.

- Melgoza L M, A. Rocha, P. F. Plata, M. Germán y T. H. Sandoval. 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): Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/579/57938403.pdf>
- Mikkelsen R. L., 2007. Biuret in urea Fertilizers. *Better Crops With Plant Food*. 91(#): 6-7.
- Miranda V. A. L., 2006. Anatomía e Fisiología Comparadas. Sistema excretor e Excreção comparados. http://www.bioloja.com/info/mini/apost/Apos_Excrec_Comp_Bioloja_demo.
- Miura H., H. Masaaki and T. Matsumoto. 1980. “Nutritional interdependence among rumen bacteria , *Bacteroides amilophilus*, *Megasphaera elsdenii* and *Ruminococcus albus*”, en *Appl. Environ. Microbial.* 40: 294-300.
- NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. National Academies Press, Washington, DC.pdf 1ª Edição.
- Poole Jr. C. P., J. Owens. 2003. Introducción a la nanotecnología. Editorial Reverté S. A.
- Rabindra N. R, V. M. Ram and A. Montanez. 2002. Decreasing Reliance on Mineral Nitrogen Yet More Food Higher. *A Journal of the Human Environment* 31(2):177-183.
- Reynolds C. K. and N. B. Kristensen. 2008. Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: An asynchronous symbiosis. *Journal Animal Science*.86:E293-E305.
- Satter L. D. and R. E. Roffler. 1975. Nitrogen requirement and utilization in dairy cattle. *Journal Dairy Science* 58 (8): 1219-37
- Tillman D. A. and S. K. Sidhu 1969. Nitrogen Metabolism in Ruminants: Rate of Animal Ammonia Production and Nitrogen Utilization by Ruminants. A Review. *Journal Animal Science*. 28: 689-697.
- Williams, A. G. and G. S. Coleman. 1992. The rumen protozoa. *Brock Springer Series in Contemporary Bioscience*. Springer-Verlag, New York. 133-164.
- Yokoyama M. T. and K. A. Johnson. 1988. Microbiology of the rumen and intestine” en D. C. Church (ed.) *The Ruminant Animal. Digestive Physiology and Nutrition*, Prentice-Hall, Nueva Jersey, 125-144.

Capítulo I

Pruebas iniciales en la elaboración y caracterización de las microcápsulas

1. 1. Introducción

Por mucho tiempo se han tratado de obtener productos que contengan urea protegida con lenta liberación y dosificación controlada a los microorganismos del rumen, pero éstos no han sido efectivos (Galo *et al.*, 2003). Existe una gran variedad de técnicas, materiales y factores que influyen en la elaboración de las microcápsulas. Por ejemplo, se desea encapsular la urea, por medio de un recubrimiento con polímero Eudragit RS 100 (Manfred y Hans-Ulrich, 2001, Kiliçarslan y Baycara, 2003), para que mantenga una liberación prolongada en el rumen del animal, evitando el rápido paso del producto por el orificio retículo ruminal y para ello se puede utilizar un acarreador poroso de Silicato de calcio (SC) para aumentar la flotabilidad y retardar la liberación de la urea al entrar en sus poros (Jain *et al.*, 2005).

La técnica de emulsión y evaporación del solvente (Pushp *et al.*, 2007), es una técnica que puede ser utilizada, es idónea aunque como todas las técnicas es muy variable en la respuesta, debido a los diferentes factores, tales como: Cantidades de polímero (Eudragit RS 100), cantidades de acarreador poroso (SC), cantidades de solventes (Etanol, Diclorometano) y factores relacionados con la fase acuosa (Temperatura, Volumen, Agitación). Los factores anteriores afectan directamente la morfología, la cantidad de urea encapsulada y la flotabilidad de las microcápsulas, además los factores se pueden cambiar para hacer variar de microcápsulas a microesferas (Jain *et al.*, 2006; Pushp *et al.*, 2007).

En base a lo diseñado en este capítulo, se establecieron las técnicas para elaborar y observar las microcápsulas en el microscopio electrónico de barrido.

1. 2 Materiales y métodos

La elaboración de microcápsulas con urea, se realizó en las instalaciones del Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.

1. 2. 1. Prueba de solubilidad de urea en etanol

Las diferentes cantidades de urea se diluyeron en 10 mL de etanol, marcando con cruces el grado de solubilidad, evaluando a simple vista y utilizando diferentes cantidades de urea: 1000, 750, 500, 250, 150, 50 en 10 mL de etanol, para poder tener microcápsulas que liberen lentamente la urea. Fue necesario diluirla en un solvente orgánico tal como el etanol, que es el que permite la entrada de la urea al acarreador poroso por medio de la ultrasonificación. El objetivo de utilizar el solvente orgánico es por la rápida evaporación.

1. 2. 2. Elaboración de microcápsulas

Se prepararon 6 lotes de microcápsulas por el método de emulsión y evaporación del solvente con modificación de los factores, la descripción de este método es basado en la elaboración de microcápsulas flotantes de silicato de calcio con repaglidina (Jain *et al.*, 2005), después se fue modificando en base a los resultados obtenidos al observar la formación de las microcápsulas en el microscopio electrónico de barrido.

a) Técnica de emulsión y evaporación de solvente

1). Preparación del acarreador poroso: Se diluyo la urea en etanol y se agregó el Silicato de calcio, después se agitó, se ultrasonificó por 2 minutos para que la urea entrara a los poros del

acarreador por medio del etanol y permitiera la salida del aire. Después, la solución se colocó dentro de una estufa a 50°C para evaporar el etanol, quedando un compuesto Silicato de calcio-Urea (SCU), **2).** **Preparación de la fase orgánica:** Se diluyó el polímero Eudragit RS 100 en la solución orgánica y se agrega el SCU, se agito perfectamente y se ultrasonificó por 2 minutos, **3) Preparación de la fase acuosa:** Primero se preparó la solución alcohol polivinilico al 75%, que fue utilizado en cada uno de los tratamientos. Se estableció el conjunto de condiciones para la fase acuosa de cada uno de los tratamientos. Los factores involucrados en la preparación de la fase acuosa son: Temperatura, Volumen de la fase acuosa y revoluciones por minuto en la agitación de la fase acuosa. **4) Preparación de las microcápsulas:** Ya que se había preparado la fase orgánica y la fase acuosa, se procedió a verter la fase orgánica gota a gota de la dentro de la fase acuosa y se agito, después se filtró en papel Whatman del número 4 y se dejó secar por 48 h, en el (Cuadro 1), se especifican las cantidades y tiempos que se emplearon en la elaboración de cada uno de los lotes de microcápsulas.

Cuadro 1. Tratamientos para la elaboración de microcápsulas como pruebas iniciales								
No. de lote	Eudragit mg	SC mg	Urea mg	Temperatura °C	VFA mL	Fase Orgánica		Agitación h
						EtOH mL	DCM mL	
1	5000	1000	500	40	200	50	25	3
2	1000	250	600	30	200	10	5	3
3	1000	500	600	40	200	10	5	3
4	1000	300	500	40	200	5	10	1.5
5	1000	300	400	50	200	4	8	1
6	1000	300	700	40	200	0	20	0.75

Polímero (Eudragit RS 100), Silicato de calcio (SC), Volumen de la fase acuosa (VFA), Diclorometano (DCM), Etanol (EtOH).

1. 2. 3. Observación de las microcápsulas en el microscopio electrónico de barrido

Para poder ver las microcápsulas al microscopio, se colocó una pequeña gota de fase acuosa con las microcápsulas en los portamuestras de latón, se dejaron secar perfectamente a temperatura ambiente y después se recubrieron con una delgada capa metálica, conductora de 5 nm, de una aleación de 80%

de oro y 20% paladio, en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-III00), y se observaron al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6390). Para observar las muestras en el microscopio electrónico son necesarias dos condiciones, que la muestra este seca y sea conductora y por eso se recubre con una capa metálica.

1. 2. 4. Materiales

Polímero (Eudragit RS 100, Marca HELM[®]), Silicato de Calcio (Marca Spectrum[®]), Carbón Activado (Charcoal activated GR for analysis, Marca Merck), Alcohol polivinilico (Poly(vinyl Alcohol), Marca Sigma[®]), Urea (USP testing specifications, Marca Sigma[®]), Agente dispersante (Tween 20 P. S. for synthesis, Marca Merck), Solvente (Diclorometano grado HPLC, Marca Merck), Solvente (Etanol grado HPLC, Marca Merck).

1. 3. Resultados

1. 3. 1. Prueba de solubilidad de urea en etanol

En esta parte se determinó la cantidad máxima que se puede utilizar de urea, en base a la solubilidad de la misma en etanol, se consideró que 250 mg era una cantidad que se diluía perfectamente en 10 ml de etanol (Cuadro 2).

Cuadro 2. Resultados de la prueba de solubilidad en Etanol. +, ++, +++, grados de solubilidad.	
Urea mg en 10 mL de Etanol	Solubilidad
1000	+
750	+
500	++
350	++
250	+++
150	+++
50	+++

1. 3. 2. Morfología

a). Técnica de emulsión y evaporación de solvente, elaboradas con 200 mL de fase acuosa a 40 °C y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica

Los resultados obtenidos de morfología con esta técnica no fueron favorables ya que evidentemente no se observaron estructuras esféricas, solo se observaron estructuras polimorfas que no corresponden a la formación de microcápsulas de tamaños que van desde aproximadamente 2 μm hasta 15 micrómetros de diámetro, esto condujo a hacer cambios en los factores que se utilizaron en la elaboración de microcápsulas (Figura 2).

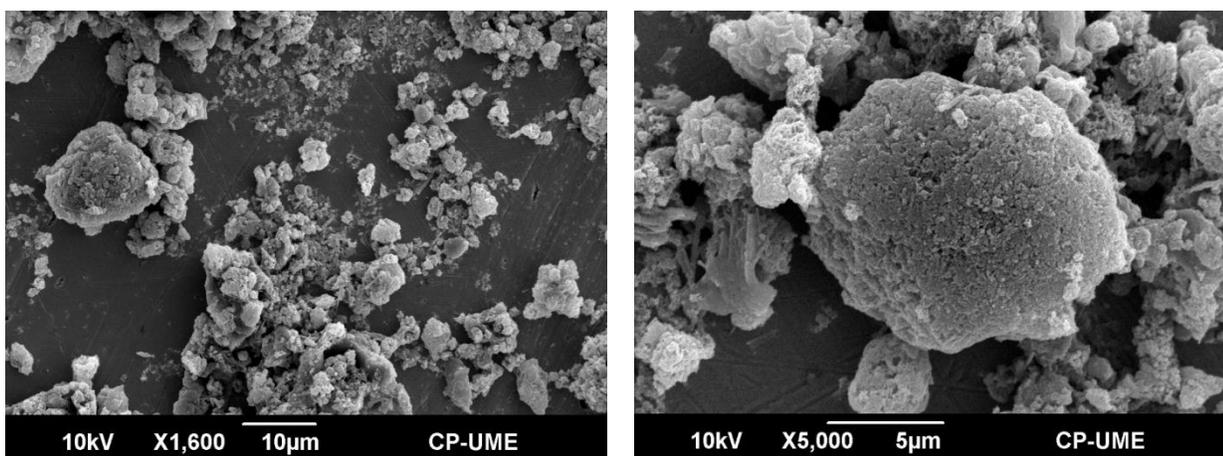


Figura 2. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 1, elaboradas con 200 mL de fase acuosa a 40 °C y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica.

b). Técnica de emulsión y evaporación de solvente, elaboradas con 200 mL de fase acuosa a 30 °C y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica.

En esta técnica los resultados no fueron favorables, obteniendo estructuras poco esféricas que presentan una superficie erosionada, posiblemente por el exceso de tiempo de agitación, además de la gran cantidad de fase acuosa y la proporción inadecuada de solventes de la fase orgánica (Figura 3.).

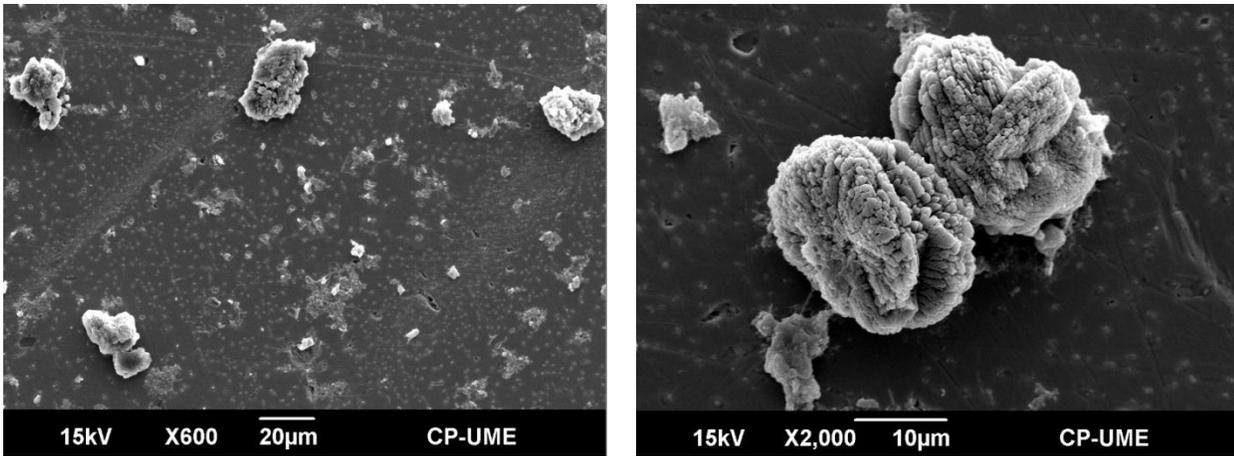


Figura 3. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 2, elaboradas con 200 mL de fase acuosa a 30 °C y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica.

c). Técnica emulsión y evaporación de solvente, elaboradas con 200 mL de fase acuosa con 500 mg de Silicato de calcio y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica

En esta técnica se aumento la cantidad de silicato de calcio resultando mayor cantidad de microparticulas amorfas, cubicas y casi esféricas, hay estructuras de tamaño aproximado desde 1 μm hasta los 90 μm. son estructuras que no presentan una morfología homogénea (Figura 4).

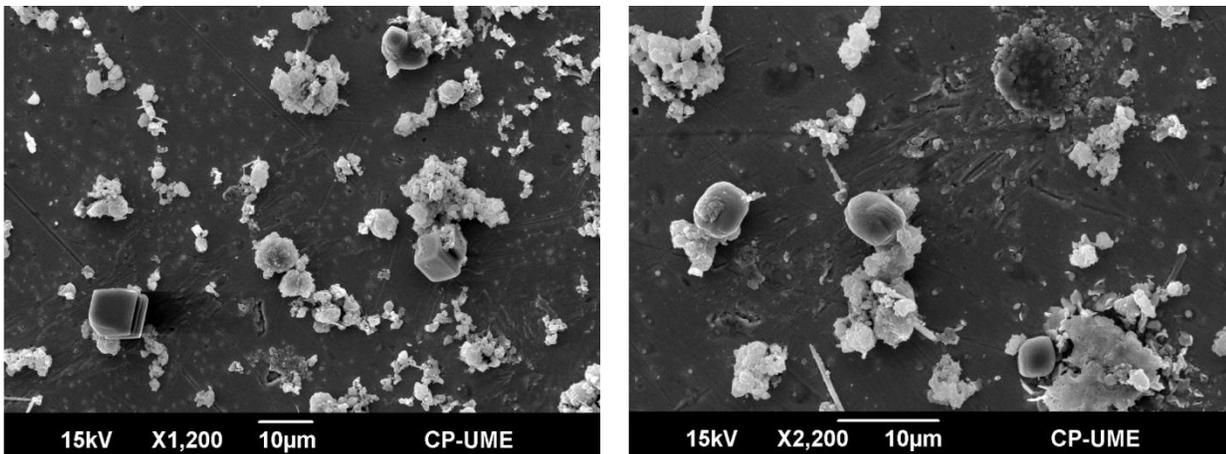


Figura 4. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 3, elaboradas con 200 mL de fase acuosa con 500 mg de Silicato de calcio y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica.

d). Técnica emulsión y evaporación de solvente, elaboradas con 40 mL de fase acuosa, 300 mg de silicato de calcio y con la proporción de etanol-diclorometano 2:1 en la fase orgánica

En esta técnica se invirtieron las cantidades de los solventes de la fase orgánica, con 5 ml de Etanol y 10 mL Diclorometano, se obtuvieron microcápsulas más esféricas, de superficie muy porosa y su tamaño es variable, que va desde los 3 a los 55 μm aproximadamente como se muestra en la imagen. El volumen de la fase acuosa, fue otro factor muy importante que influyó en la formación de las microcápsulas de esta técnica (Figura 5).

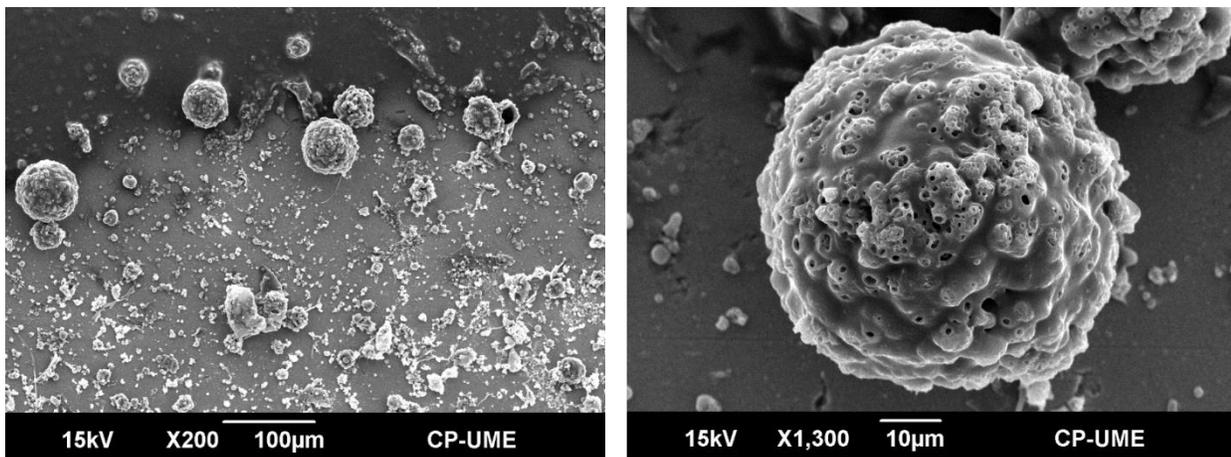


Figura 5. Micrografía electrónica de barrido con micropartículas amorfas que corresponden a la técnica 4, elaboradas con 40 mL de fase acuosa, 300 mg de silicato de calcio y con la proporción de diclorometano-etanol 2:1 en la fase orgánica.

e). Técnica emulsión y evaporación de solvente, elaboradas con 50 mL de fase acuosa y con la proporción etanol-diclorometano 1:2 en la fase orgánica

En esta técnica los resultados fueron diferentes en la morfología, fueron más densas y en gran proporción se precipitaron en un medio líquido. En esta técnica se invirtieron y redujeron las proporciones de los solventes de la Fase orgánica, con 8 mL de Diclorometano y 4 mL de Etanol y en esta técnica se utilizaron 50 mL de fase acuosa (Figura 6).

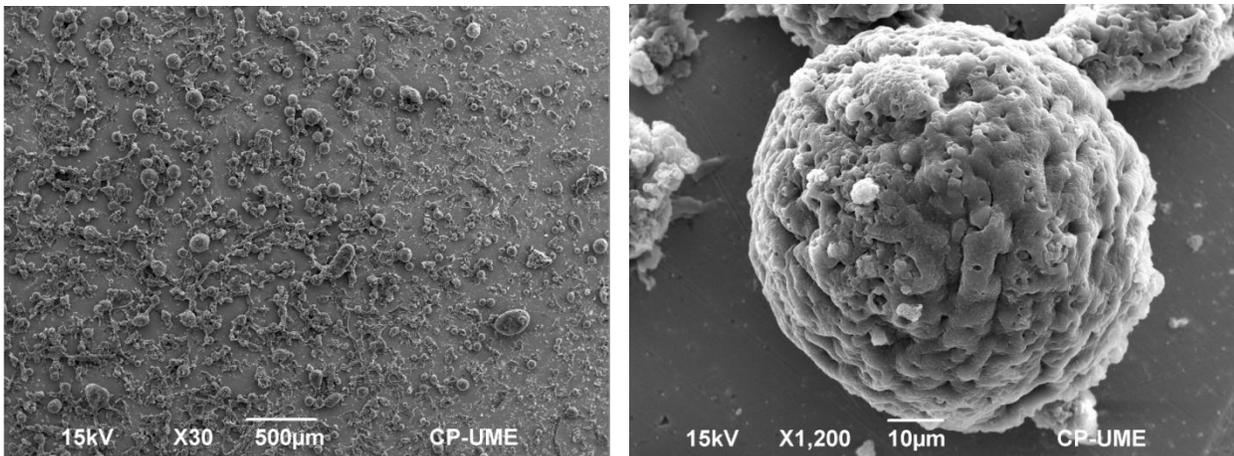


Figura 6. Micrografía electrónica de barrido con microcápsulas que corresponden a la técnica 5, elaboradas con 50 mL de fase acuosa y con la proporción etanol-diclorometano 1:2 en la fase orgánica.

f). Técnica emulsión y evaporación de solvente, elaboradas con 50 ml de fase acuosa y solo con diclorometano en la fase orgánica

Esta técnica resulto ser favorable, evidentemente hubo una buena formación de microcápsulas completamente esféricas y su tamaño aproximado varía entre 5 hasta 50 µm. La fase orgánica se preparó solo con Diclorometano, este cambio junto con la disminución del volumen de la fase acuosa permitió obtener microcápsulas mejor formadas (Figura 7).

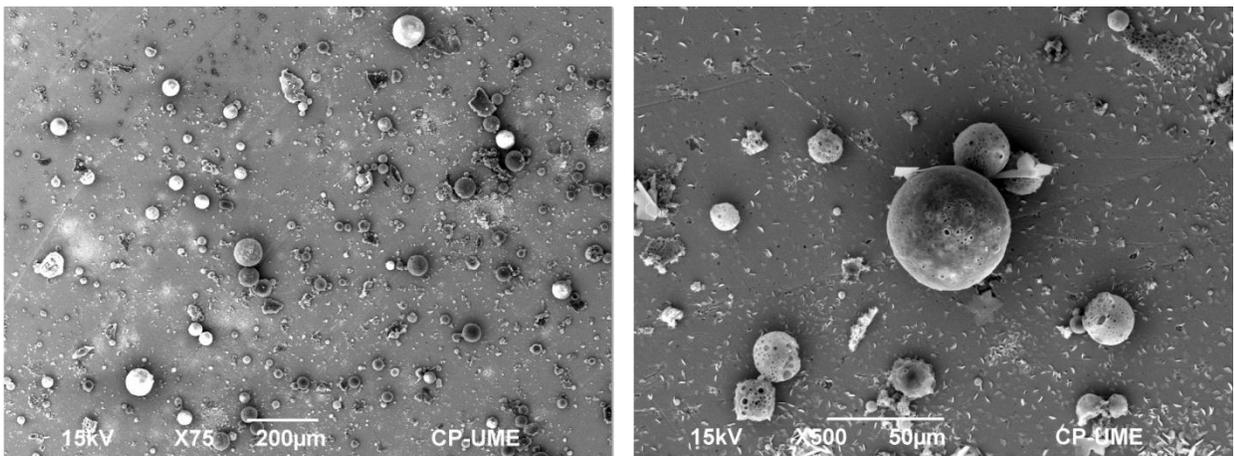


Figura 7. Micrografía electrónica de barrido con microcápsulas amorfas que corresponden a la técnica 6, elaboradas con 50 ml de fase acuosa y solo con diclorometano en la fase orgánica.

1. 4. Discusión

Hubo mejor y mayor formación de las microcápsulas cuando se invirtieron las cantidades de etanol y diclorometano, e incluso fue mejor cuando se utilizó solo diclorometano, al disminuir la cantidad de solventes la viscosidad aumenta y es posible formar microesferas en vez de microcápsulas (Nokhodchi *et al.*, 2005). Algo que también posiblemente afectó el resultado fue cuando se utilizó menor volumen de la fase acuosa con mejor formación de las microcápsulas, de igual forma las revoluciones por minuto afectan en el tamaño de las microcápsulas debido a que la agitación permite hacer pequeños glóbulos de fase orgánica y a mayor agitación son más pequeños (Jain *et al.*, 2005). El objetivo de aumentar la temperatura fue acelerar la evaporación del solvente de la fase orgánica que estaba dispersa dentro de la fase acuosa, cuando la temperatura fue demasiado baja la fase acuosa fue más susceptible a adherirse a la propela y al recipiente en donde se agita. Cuando la temperatura es elevada, el solvente de la fase acuosa se evapora rápidamente y las microcápsulas no se forman quedando estructuras porosas polimorfos (Sato *et al.*, 2004). Son muchos los factores que están relacionados y son motivo de estudio para obtener las microcápsulas con una adecuada morfología y por eso es necesario recurrir a un diseño experimental factorial fraccionado 2^{k-1} explicado en el Capítulo II.

1.5. Conclusiones

La técnica inicial fue modificada en base a los resultados que se obtuvieron, y se concluye que con la técnica de emulsión y evaporación de solvente se pueden fabricar microcápsulas para diferentes aplicaciones y en este caso fue para encapsular urea. Es evidente que cada uno de los factores afecta directamente en los resultados de morfología de las microcápsulas. En el siguiente Capítulo se estableció un diseño experimental factorial, con el que se evaluaron estadísticamente los efectos de los factores más importantes como Volumen, Temperatura, Revoluciones por minuto al agitar la fase acuosa. Así mismo, la cantidad de polímero y diclorometano de la fase orgánica.

1. 5. Literatura citada

- Galo E, S. M. Emanule, C. J. Sniffen, J. H. White and J. R. Knapp. 2003. "Effects of a polymer-coated urea production nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle". *Journal Dairy Science*. 86:2154-2162.
- Jain K. Sunil, A. M. Awasthi, N. K. Jain, G. P. Agrawal. 2005. Calcium silicate microspheres of repaglinide for gastroretentive floating drug delivery: Preparation and in vitro characterization. *Journal of Controlled Release* 107 300:309.
- Jain S. K., G. P. Agrawa, and N. K. Jain. 2006. "Evaluation of Porous Carrier-based Floating Orlistat Microspheres for Gastric Delivery". *AAPS Pharmacy Science Technology*. 7 (4) Article 90 (<http://www.aapspharmscitech.org>).
- Kılıçarslan M and T. Baykara 2003. "The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres". 252: 99-109.
- Manfred A. y Hans-Ulrich P. 2001. Agente de recubrimiento y aglutinante termoplástico para formas farmacéuticas. *Oficina Española de Patentes y Marcas*. Numero de publicación: 2: 158-155.
- Nokhodchi A., Mitra J., Mohammad-Reza S., Siavoosh D. 2005. The Effect of Formulation Type on the Release of Benzoyl Peroxide from Microsponges. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1: 131-142
- Pushp R. N., C. Myung-Kwan, C. Hoo-Kyun. 2007. Prepared of floating microspheres for fish farming. *International Journal of Pharmaceutics* 341:85-90.
- Sato Y, Y. Kawashima, H. Takeuchi, H. Yamamoto. 2004. In vitro evaluation of floating and drug releasing behaviors of hollow microspheres (microballoons) prepared by the emulsion solvent diffusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57 235–243.

Capítulo II

Diseño y evaluación de microcápsulas de urea *in vitro* en líquido ruminal

2. 1. Introducción

Las nuevas líneas de investigación en nutrición de rumiantes están buscando diseñar productos de liberación prolongada de urea dentro del rumen, con el objetivo de proporcionar N amoniacal para la formación de proteínas de origen bacteriano. En el rumen se realiza la fermentación a través de los microorganismos (Doetsch y Robinson, 1952), tales como, bacterias, protozoarios y hongos. Actualmente las bacterias son las de mayor población y las aportan la mayor parte de proteína de origen microbiano, específicamente fuentes de aminoácidos para el rumiante (Walli, 2005).

Las bacterias requieren de N amoniacal para la síntesis de proteínas (NRC, 2001, Lapierre y Lobley, 2001), la urea es una fuente de NNP que se usa en las dietas para rumiantes (Arelovich *et al.*, 1998, Kononoff *et al.*, 2006). Por mucho tiempo se ha utilizado la urea en la alimentación del ganado (NRC, 2001), pero su mala administración ha causado problemas de intoxicación a los animales (Davidovich *et al.*, 2009, Bartley *et al.*, 1976; Bartley *et al.*, 1881). La urea en el rumen es convertida rápidamente en amoniaco por las enzimas bacterianas (Galo *et al.*, 2003), esta fuente de N es rápidamente absorbida por las paredes del rumen, en forma de NH_3 o NH_4 dependiendo del pH ruminal (Abdoun *et al.*, 2007).

Existen algunos compuestos de lenta liberación de N, como el biuret (Löest *et la*, 2001) y Optigen[®] (McVey y Laurenson 2004), pero la dinámica de liberación de N amoniacal no es favorable, por este motivo se están buscando alternativas para elaborar microcápsulas, con el propósito de mantener una liberación constante de N amoniacal en el rumen (Jain *et al.*, 2005). En la actualidad se puede utilizar diversos polímeros, por ejemplo el Eudragit RS 100 (Kiliçarslan y Baycara, 2003), éste es un polímero pH-dependiente que se ha usado en la encapsulación de medicamentos para ser liberados por vía oral (Russel y Dombrowsky, 1980, Osakwe y Steingass, 2006). El objetivo de esta investigación fue elaborar microcápsulas con urea y evaluar su liberación en líquido ruminal.

2. 2. Materiales y métodos

La microcápsulas con urea, se elaboraron en el Laboratorio Experimental Multidisciplinario de Farmacia, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM. La observación de las microcápsulas se realizó en el laboratorio de microscopía electrónica en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y La determinación de nitrógeno encapsulado se realizó en el laboratorio de Fertilidad de Suelos, del área de Edafología, en el Colegio de Postgraduado, Campus Montecillo.

2. 2. 1. Preparación de las microcápsulas

Las microcápsulas se prepararon por el método de emulsión y evaporación del solvente (Kawashima *et al*, 1992, Kumar *et al*, 2005), y para su mayor entendimiento el proceso se dividió en 4 pasos.

1). Preparación del acarreador poroso: El primer paso fue preparar el Acarreador poroso, ya sea Silicato de calcio o Carbón activado para cada uno de los lotes: se diluyen 250 mg de urea en 10 ml de etanol y se agregaron 350 mg de Acarreador poroso, Después, cada tratamiento fue agitado y ultrasonificado para extraer el aire que hay dentro de los poros del acarreador poroso y facilitar la entrada de el etanol con la urea. Después, la solución fue colocada en una estufa a 50 ° C para evaporar el etanol, obteniendo compuestos de Silicato de calcio-Urea (SCU) o Carbón activado-Urea (CAU). **2) Preparación de la fase orgánica:** Dependiendo del tratamiento que se preparó en ese momento se diluyen 1.5 o 2 g de Eudragit RS100 en diclorometano (15 o 20 ml), se agitó bien y se agregó el acarreador poroso (SCU o CAU), se diluyó y ultrasonificó perfectamente para adherir el polímero a las partículas del acarreador poroso. **3) Preparación de la fase acuosa:** Primero se preparó la solución Polyvinyl alcohol al 75% que fue utilizado para los 32 tratamientos. El conjunto de condiciones para la fase acuosa de cada uno de los 32 tratamientos fue diferente por la combinación de los factores. Los factores involucrados en la preparación de la fase acuosa son: 35 o 45 ° C, 50 o 100 mL de Volumen y 500 o 600 rpm en la agitación. **4) Adición de la fase orgánica dentro de la fase acuosa:** la fase orgánica fue vertida dentro de la fase acuosa y se agito por 45 minutos, después las microcápsulas fueron aisladas de la fase acuosa filtrando con papel Whatman No. 4, se lavaron tres veces con agua destilada y se secaron dentro de una estufa a 45 ° C por 48 h.

2. 2. 2. Caracterización de las microcápsulas

Las microcápsulas se identificaron por microscopía electrónica de barrido, determinando su morfología y tamaño. Además se determinó el porcentaje de N en las microcápsulas y el porcentaje de flotabilidad a las 12 h.

2. 2. 3. Observación de la morfología y tamaño de las microcápsulas en el microscopio electrónico de barrido

Sobre los portamuestras de latón se les colocó una gota de la fase acuosa de cada tratamiento, se secaron a temperatura ambiente, se recubrieron con una delgada capa metálica, conductora de 5 nm, formada de una aleación de 80% de oro y 20% paladio, en una ionizadora de metales (Ion Sputter JFC-III00), y se observaron al microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6390).

2. 2. 4. Determinación de la cantidad de urea dentro de las microcápsulas

La concentración de urea se determinó con un cuantificador de N total TOC-V_{CSN} y TNM-1 Shimadzu[®]. El equipo funciona midiendo la quimioluminiscencia producida por la oxidación del N de la muestra. Primero se hizo una digestión, 100 miligramos de microcápsulas de cada tratamiento fueron puestas en tubos de ensayo de 60 ml, posteriormente se adicionaron 25 ml de ácido sulfúrico concentrado y 1.2 g de mezcla catalizadora. Los tubos se colocaron en la parrilla de digestión, incrementando paulatinamente la temperatura hasta los 360 °C por 1 h. Luego, se filtró la muestra, se ajustó a un pH de 3 y se aforó a 100 mL para cuantificar el N total. El blanco se preparó con ácido sulfúrico y mezcla catalizadora, con el fin de restar el N de otros compuestos que no pertenecían a las microcápsulas. Se cuantificó el contenido de N total en las microcápsulas, se preparó una curva a partir de soluciones de 50 ppm de nitrato de potasio para obtener una curva con 0, 10, 25, 33.33 y 50 ppm.

2. 2. 5. Evaluación de la flotabilidad de las microcápsulas

Se evaluó la flotabilidad en todos los tratamientos formados de la combinación de los factores estudiados. Las microcápsulas se colocaron en una solución que simula la densidad del líquido ruminal, hecho a base de agua y un factor espesante Tween 20. La solución se reguló a pH neutro y densidad de 1.035. En un tubo de polipropileno se adicionó 35 mL de solución y 100 mg de microcápsulas, agitándose por 12 h en un carrusel Glas-Col[®] con 45 rpm e inclinación de 45°. Posteriormente las muestras se colocaron en embudos de separación, permaneciendo en reposo por 50 min. Se eliminó el precipitado y el sobrenadante se filtró. Las muestras se lavaron tres veces con 10 ml de agua y se secaron a 60 °C por 24 h. Las diferencias en los pesos de las microcápsulas fueron usados para la determinación del porcentaje de flotabilidad.

2. 2. 6. Liberación *in vitro* de nitrógeno amoniacal de las microcápsulas en líquido ruminal

La digestibilidad se hizo con el procedimiento de Tilley y Terry (1963). El líquido ruminal se obtuvo de una vaca canulada. Se evaluaron 5 tratamientos: 1). Microcápsulas de Silicato de Calcio, 2). Microcápsulas con Carbón Activado, 3). Polímero Eudragit RS 100, 4). Urea no protegida, 5). Control, solo con líquido ruminal. La cantidad de urea en cada tratamiento fue de 7.5 mg de urea. Después se extrajo 3.2 mL de muestra en los tubos de cada tratamiento para detener la digestión a las 0, 0.83, 0.25, 0.50, 1, 2, 6, 12 y 24 h. Las muestras se colocaron en 0.8 mL de ácido metafosfórico con el fin precipitar las proteínas para evitar que interfieran en la lectura, se refrigeraron y se centrifugaron a 3000 g por 10 min, después se extrajeron 20 µL de muestra mezclada con ácido metafosfórico, se le añadió 2 mL de fenol:hipoclorito de sodio (50:50), se colocaron los tubos en baño maría a 7°C por 30 minutos y se les agregó 5 mL de agua. La lectura se hizo en un espectrofotómetro de luz ultravioleta a 630 nm. Previo a la lectura se preparó la curva de calibración con NH₄CL, colocando alícuotas con 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, y 35 mg/dL, se agregó 5 ml de agua y los tubos se colocaron en baño maría por 30 minutos previo a la lectura en el espectro fotómetro.

2. 2. 7. Diseño experimental

Fue un diseño experimental factorial fraccionado 2^{K-1} , con 32 tratamientos elaborado en JMP por el método *Screening design*. Se utilizaron 6 factores con 2 niveles cada uno. Los factores y niveles a estudiar fueron: 1). Temperatura de la fase acuosa en el momento de adicionar la fase orgánica T° (35 y 45 °C), 2). Revoluciones por minuto en la agitación de la fase acuosa RPM (500 y 600 rpm), 3). Volumen de la fase acuosa de alcohol Polivinílico VFA (50 y 100 mL), 4). Cantidad de solvente en la fase orgánica “Diclorometano” DCM (15 y 20 mL), 5). Cantidad de polímero Eudragit RS 100 POLI (1.5 y 2 g) y 6). Tipo de acarreador poroso (SCU, CAU).

2. 3. Resultados

2. 3.1. Formación de las microcápsulas flotantes

Las microcápsulas se observaron en el microscopio electrónico de barrido (Fig. 1). Hubo presencia de huecos de diferentes tamaños en el centro y poros sobre la superficie de las microcápsulas. Los valores de las imágenes en las microcápsulas se analizaron en JMP por el método de *effect screening*, se asignaron categorías 1 a 5 por triplicado aleatoriamente, demostrando que hubo diferencias significativas en el factor temperatura, en su nivel bajo de 35°C ($p < 0.05$) con un valor categórico de 3.900 ± 0.207 , lo cual indica mejor formación de las microcápsulas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Evaluación de la morfología de las microcápsulas por el método *Effect Screening* con el programa JMP

Factores	Media y EE Categorías del 1 al 5	Prob>[t]	Estimado
T° (35°C)	3.900± 0.207	0.035*	0.919
RPM (600)	3.337± 0.207	0.084	0.356
DCM (15mL) POLI (1.5g)	3.262± 0.207	0.097	0.281
DCM (15mL)	3.249± 0.207	0.127	0.269
Poli (1.5 g)	3.174± 0.207	0.166	0.194

* muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

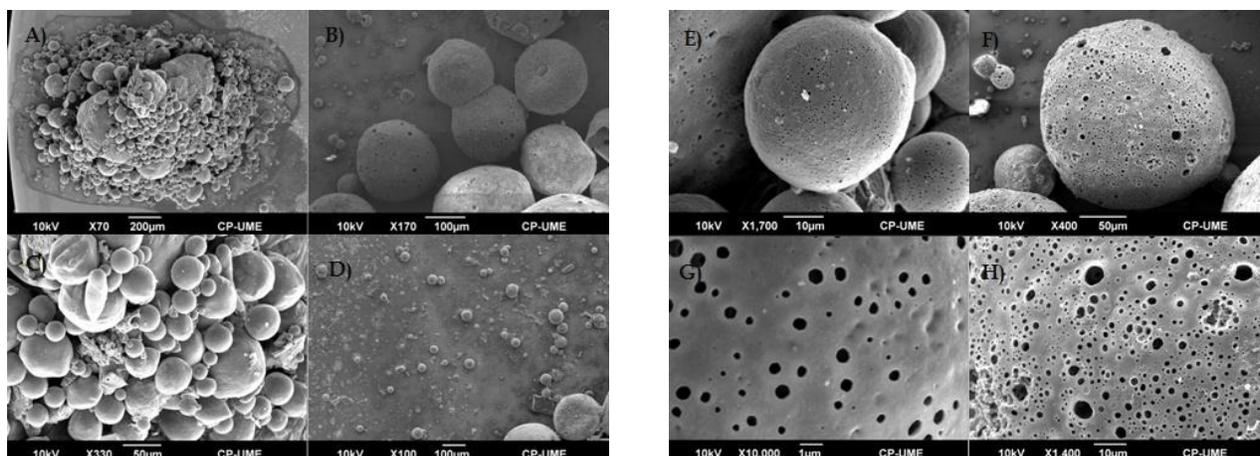


Figura 8. A y B) Microcápsulas con Carbón activado T° 35°C ,C) y D) Microcápsulas con Silicato de Calcio T° 35 °C. Figura 9.

E) y F) Microcápsulas con Carbón activado T° 35 °C, G) y H) Microcápsulas con Silicato de Calcio T° 35 °

2. 3. 2. Urea encapsulada

La cantidad de urea encapsulada fue baja en comparación a la cantidad de urea que se usó en el proceso de elaboración de las microcápsulas, los datos obtenidos se evaluaron por el método *effect screening* en el programa JMP, presentando diferencias significativas en el factor volumen de la fase acuosa en su nivel de 50 ml ($p < 0.05$), con una media de 4.662 ± 0.224 mg/g de urea. Se presentó un efecto negativo en la encapsulación de la urea, también se observó que la temperatura favoreció la solubilidad de la urea (Kroes y Reiss, 1989), disminuyendo la cantidad de urea encapsulada, en este caso mostró mejor respuesta con el factor Temperatura en su nivel bajo de 35°C en comparación al nivel alto de 40°C (Cuadro 4). La urea utilizada se distribuyó en diferentes partes y también fue cuantificada en el agua residual de la fase acuosa, se estimó la pérdida de urea en el proceso de elaboración y se muestra en el (Cuadro 5).

Cuadro 4. Evaluación de la encapsulación de urea por el método *Effect Screening* con el programa JMP

Factores sobresalientes	Media y EE mg/g	Prob>[t]	Estimado
VFA (50mL)	4.662 ± 0.224	0.034*	0.421
T° (35°C)	4.521 ± 0.224	0.134	0.280
VFA (50mL)*A(CA)	4.488 ± 0.224	0.181	0.247
T° (35°C)*VFA (50mL)	4.473 ± 0.224	0.207	0.232
ACARREADOR (CA)	4.437 ± 0.224	0.281	0.196

* muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

Cuadro 5. Distribución de los 250 mg del nitrógeno utilizado en el proceso elaboración de las microcápsulas

Factores sobresalientes	Urea total encapsulada	Líquidos Media y	Perdida en el proceso de elaboración en mg
	Media y EE en mg	EE en mg	
VFA (50mL)	7.884 ± 0.495	183.029 ± 0.264	59.087 ± 2.633
T° (35°C)	7.368 ± 0.495	184.641 ± 0.264	57.990 ± 2.633
VFA (50mL)*A(CA)	7.418 ± 0.495	186.168 ± 0.264	56.414 ± 2.633
T° (35°C)*VFA (50mL)	7.355 ± 0.495	190.473 ± 0.264	56.779 ± 2.633
ACARREADOR (CA)	7.172 ± 0.495	191.514 ± 0.264	57.636 ± 2.633
EEM	0.119	1.648	69.087

2. 3. 3. Flotabilidad de las microcápsulas

Se obtuvo una respuesta mayor de 50 % de flotabilidad de las microcápsulas a las 12 h de agitación, presentando diferencias significativas en el factor Volumen de la Fase Orgánica, en su nivel alto con 20 mL ($p < 0.05$), con un porcentaje de flotabilidad de 53.857 ± 1.479 . Los demás factores no presentaron diferencias significativas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Evaluación de la flotabilidad de las microcápsulas por el método *Effect Screening* con el programa JMP

Factores	Medias	Prob>[t]	Estimado
DCM(20mL)	53.857 ± 1.479	0.0005*	5.353
T°(35°C)	50.276± 1.479	0.1211	1.772
T°(35°C) Acarreador (CA)	50.165± 1.479	0.1432	1.662
DCM(20mL)POLI (1.5g)	50.036± 1.479	0.1736	1.532
VFA (100 mL)*Acarreador (CA)	48.684± 1.479	0.2916	0.180

* muestran diferencias significativas ($p < 0.05$).

2. 3. 4. Cinética de liberación *in vitro* de nitrógeno amoniacal de las microcápsulas

La liberación del N amoniacal en las microcápsulas elaboradas con silicato de calcio y las de carbón activado fueron similares. La liberación de N amoniacal aumentó aun después de las 24 h en el líquido ruminal. El tratamiento con urea, la liberación de N amoniacal fue inicialmente bajo, pero después de 1h el N amoniacal aumentó rápidamente, posteriormente entre las 12 y las 24 h, disminuyó la concentración de N amoniacal en el líquido ruminal. El tratamiento con polímero tuvo una respuesta similar al tratamiento control, en ambos hubo una concentración menor de 0.2 mg/dL (Figura 10)

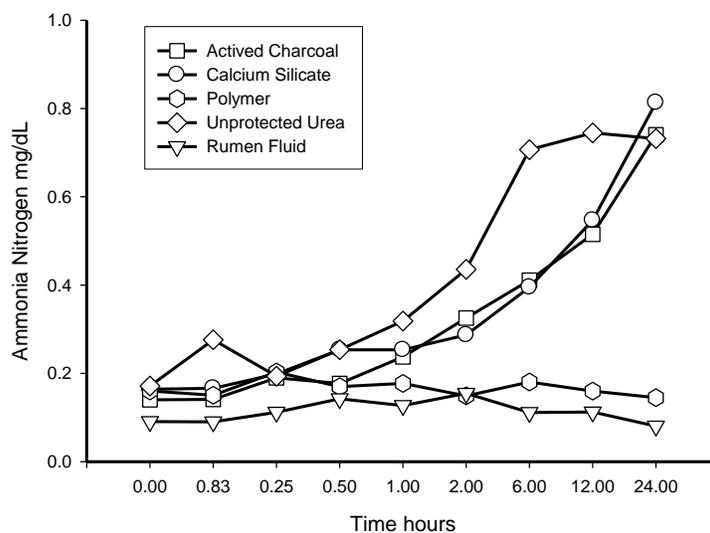


Figura 10. Cinética de liberación de nitrógeno amoniacal de las microcápsulas *in vitro* en líquido ruminal

2. 4. Discusión

El tamaño de las microcápsulas producidas por la técnica de emulsión y evaporación del solvente es muy variable (Kumar *et al.*, 2005). La morfología de las microcápsulas depende de la rotación de las micelas de fase orgánica dentro de la fase acuosa, pero también depende de la velocidad de evaporación del solvente, el diclorometano es un solvente volátil, que al aumentar la temperatura aumenta la evaporación (Jiin-Long *et al.*, 2004). En este experimento la formación de las microcápsulas resultó tener mejores resultados cuando la temperatura de la fase acuosa fue de 35 °C, en comparación con la temperatura de 45 °C, es por eso que a altas temperaturas la formación de micropartículas no es esférica.

La encapsulación de la urea fue mejor cuando el volumen de la fase acuosa fue de 50 ml. La urea es higroscópica y tiene alta solubilidad en agua (Kroes y Reiss, 1989), incluyendo los fluidos corporales (Abdoun *et al.*, 2007). La temperatura influyó en la solubilidad de la urea, a mayor temperatura mayor solubilidad (Kroes y Reiss, 1989). Por lo tanto, cuando se agregó la fase orgánica dentro de la fase acuosa, la urea que estaba en la fase orgánica se solubilizó dentro de la fase acuosa y en consecuencia la urea retenida dentro de las microcápsulas fue menor.

La flotabilidad depende de la densidad, en consecuencia, a mayor porosidad aumenta la flotabilidad (Jain *et al.*, 2005, Jain., 2006). Por lo tanto, la evaporación del diclorometano en el centro de las microcápsulas ocasionó la porosidad, este resultado indica que la mayor concentración del diclorometano 20 mL mejoró la flotabilidad, en comparación con la concentración de 15 mL de diclorometano (Pushp *et al.*, 2007).

No existe información en la cinética de liberación de la urea microencapsulada con Eudragit RS 100, esto se debe a que es un producto de reciente uso en el desarrollo de micropartículas. Por lo tanto, el inicio de la investigación en este producto solo se discutirá con investigaciones relacionadas a la liberación de medicamentos que se microencapsulan con Eudragit RS 100 (Manfred y Hans-Ulrich, 2001), Los resultados obtenidos en la cinética de liberación del N amoniacal fueron favorables en los tratamientos con microcápsulas de SCU y CAU, mostrando una concentración de 0.237 mg/dL de N Amoniacal en la primera hora, de ahí

fue aumentando constantemente hasta llegar a las 12 h a una concentración mayor de 0.700 mg/dL, y lo más importante, ambos tratamientos con una tendencia al aumento después de las 12 h de digestibilidad, esto podría deberse a la erosión del polímero y difusión de la urea, tal como se menciona en estudios con medicamentos encapsulados con Eudragit RS100 que liberan el activo después de las 12 h (Sato *et al.*, 2004). El grupo control mostró recirculación del N amoniacal en el medio, *in vivo* esto no sucede en el rumen, ya que las mismas paredes absorben el N amoniacal para llevarlo a la vía sanguínea y evitar su acumulación en el líquido ruminal (Abdoun *et al.*, 2007). El tratamiento con Eudragit RS 100, mantuvo los niveles de N amoniacal menos de 0.2 mg/dL, debido a que en este periodo de tiempo las bacterias posiblemente no tuvieron disposición de N del polímero por su estructura y presentación granulada (Manfred y Hans-Ulrich, 2001). El grupo control fue similar al tratamiento que contenía el polímero con niveles por debajo de 0.2 mg/dL.

2. 5. Conclusión

La técnica de emulsión y evaporación no fue efectiva en la microencapsulación de activos solubles en agua. La urea es soluble en agua y por este motivo se encapsuló una mínima cantidad. Los resultados proporcionaron información importante, mostrándonos como los diferentes factores afectan la formación de las microcápsulas, encapsulación de urea y flotabilidad de las microcápsulas. Hubo una adecuada respuesta de la lenta liberación de N amoniacal en la digestión *in vitro* que simula las condiciones del rumen. Es favorable el uso del polímero Eudragit RS 100, en este estudio. Sin embargo, otras alternativas puede ser el estudio de la técnica de spray dry.

2. 6. Literatura citada

- Abdoun K., F. Stumpff and H. Martens. 2007. Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Animal Health Research Review* 7: 43-54.
- Arelovich H. M., G. W. Owen, J. A. Horn and J. A. Vizcarra. 1998. "Urea utilization by cattle fed prairie hay and supplemented with zinc". *Animal Science Research*.
- Bartley E. E., A. D. Davidovich, G. W. Barr, G. W. Griffel, A. D. Dayton, C. W. Deyoe and R. M. Bechtle. 1976. Ammonia Toxicity in Cattle. I. Rumen and Blood Changes Associated with Toxicity and Treatment Methods. *Journal Animal Science*. 43: 835-841.
- Bartley. E. E., T. B. Avery, T. G. Nagaraja, B. R. Watt, A. Davidovich, S. Galitzer and B. Lassman, 1981. Ammonia toxicity in cattle. V. Ammonia concentration of lymph and portal, carotid and jugular blood after the ingestion of urea. *Journal Animal Science*. 53, 494-498.
- Davidovich H. M., F. N. Owens, G. W. Horn and J. A. Vizzcarra. 2009. "Effects of supplemental zinc and manganese on ruminal fermentation forage intake, and digestion by cattle fed prairie hay and urea". *American Society of Animal Science*. 78: 2972-2979.
- Doetsch R. N. and R. Q. Robinson. 1952. The bacteriology of the bovine rumen: A review. *Maryland Agriculture Experiment Station*. A397: 2390.
- Galo E, Emanule SM, Sniffen CJ, White JH and Knapp. 2003. "Effects of a polymer-coated urea production nitrogen metabolism in lactating Holstein dairy cattle". *Journal Dairy Science*. 86: 2154-2162.
- Jain S. K., A. M. Awasthi, N. K. Jain, G. P. Agrawal. 2005. Calcium silicate microspheres of repaglinide for gastroretentive floating drug delivery: Preparation and in vitro characterization. *Journal of Controlled Release* 107: 300-309.
- Jain S. K., G. P. Agrawa, and N. K. Jain. 2006. "Evaluation of Porous Carrier-based Floating Orlistat Microspheres for Gastric Delivery". *AAPS Pharmacy Science Technology*. 7 (4) Article 90 (<http://www.aapspharmscitech.org>).
- Jiin-Long C, Y. Ming-Kung and C. Chiao-Hsi 2004. Dichloromethane evaporative behavior during the solidifying process of ovalbumin-loaded ooly (DL lactic-co-glycolic acid) microparticles *Journal of food and drug analysis*, 12: 291-298

- Kawashima Y., T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, Y. Itoh. 1992. Hollow microspheres for use as a floating controlled drug delivery system in the stomach. *Journal Pharmaceutics Science*. 81: 135–140.
- Kılıçarslan M and Baykara T. 2003. “The effect of the drug/polymer ratio on the properties of the verapamil HCl loaded microspheres”. 252: 99-109.
- Kononoff P. J., Heinrichs A. J., Pas and N. T. Gabler. 2006. “The effect of nitrogen and forage source on feed efficiency and structural growth of prepubertal holstein heifers”. *The Professional Animal Scientist*. 22, 84-88.
- Kumar S. A., R. D. Nayanrao., S. Wadhwa. 2005. Floating microspheres of cimetidine: Formulation, characterization and in vitro evaluation. *Acta Pharmaceutica*. 55: 277–285.
- Kroes L. R. and A. D. Reiss. 1989. Development of new techniques for the characterization of crystals and their growth solution. NASA Technical Memorandum NASA TM- 1003771.
- Lapierre H., G.E. Lobley. 2001. Nitrogen Recycling in the Ruminant: A Review. *Journal of Dairy Science* 84: E223-E236.
- Löest, C. A., E. C. Titgemeyer, J. S. Drouillard, B. D. Lambert, and A. M. Trater. 2001. Urea and biuret as nonprotein nitrogen sources in cooked molasses blocks for steers fed prairie hay. *Animal Feed Science Technology*. 94:115.
- Manfred A. y P. Hans-Ulrich. 2001. Agente de recubrimiento y aglutinante termoplástico para formas farmacéuticas. *Oficina Española de Patentes y Marcas*. Numero de publicación: 2 158 155.
- Mc Vey M. and L. P. Laurenson. 2004. Potential concentration of Optigen® residues in the environment and a comparison to similar residues from other sources, For the environmental assessment of optigen® controlled release urea. Altech biotechnology center. Food & Drug Administration. Center for Veterinary Medicine. Division of Animal Feeds. November 5, 2004 pp 1-16. <http://www.fda.gov/OHRMS/DOCKETS/98fr/04f-0546-ea00001.pdf>
- NRC (National Research Council). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Washington, DC. US National Academies Press.
- Osakwe I. I. y H. Steingass. 2006. Ruminal fermentation and nutrient digestion in West African Dwarf (WAD) sheep fed *Leucaena leucocephala* supplemental diets. *Agroforestry Systems*. 67: 129-133.

- Pushp R. N., C. Myung-Kwan, C. Hoo-Kyun. 2007. Prepared of floating microspheres for fish farming. *International Journal of Pharmaceutics* 341: 85-90.
- Russell J. B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. *Applied and environment microbiology*. 39 604-610
- Sato Y., Y. Kawashima, H. Takeuchi, H. Yamamoto. 2004. In vitro evaluation of floating and drug releasing behaviors of hollow microspheres (microballoons) prepared by the emulsion solvent diffusion method. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 57: 235–243.
- Tilley J M A. and R A Terry. 1963. “A two-stage technique for the in vitro digestion of forage crops”. *Journal British. Grassland Society*. 18:104-11.
- Walli T. K. 2005. Bypass protein technology and the impact of feeding by pass protein to dairy animals in tropics: A review. *Indian Journal of Animal Sciences* 75: 135-142.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

3. 1 Conclusiones

No se obtuvo un producto con elevado porcentaje de encapsulado de urea y que mantenga los niveles adecuados de amoniacó dentro del rumen por tiempos prolongados. Sin embargo, este estudio aporta información que nos puede ayudar a buscar nuevas alternativas de encapsulación de nutrientes, debido a que por la técnica de emulsión y evaporación de solvente se obtuvieron microcápsulas, Con respecto al polímero que se utilizó, mostró efectividad en la cinética de liberación de urea *in vitro* dejando escapar lentamente la urea por tiempo prolongado.

3. 2. Recomendaciones

Se recomienda hacer mas estudios de la encapsulación de urea, por un método en el que la urea no interactúe con una fase acuosa, debido a que al usar agua en el proceso de encapsulación, la urea por ser higroscópica tiende a solubilizarse escapando de la encapsulación. El método de emulsión y evaporación de solvente es efectiva para encapsular sólidos o sustancias hidrofobias, para asegurar un elevado porcentaje de encapsulación del activo.