

DETERMINACION DE ACIDOS GRASOS VOLATILES EN LIQUIDO RUMINAL

Por Nicolás Miguel Piovano

RESUMEN

Dada la gran importancia de los Acidos Grasos Volátiles en el contenido ruminal de los bovinos, se han obtenido dichos valores en el ganado clínicamente normal, en nuestros medios. Se han estudiado analíticamente algunos métodos, adoptándose el de Scarisbrich, al que se le han introducido algunas variantes. Se ha determinado el lapso óptimo de extracción de la muestra a partir de la ingesta, estimándolo en 120 minutos. Se han obtenido valores medios de Acidos Grasos volátiles Totales de 0,546 g ‰ (expresados en ácido acético), con una variación de $\pm 0,037$. Se hace como complemento una ligérrima reseña fisiológica y bioquímica del rumen y de los procesos fermentativos en él y del metabolismo de los mencionados Acidos Grasos Volátiles.

VOLATILE FATTY ACIDS IN THE PAUNCH CONTENT DETERMINATION

SUMMARY

In view the great importance of Volatile Fatty Acids in the paunch content of cattle, such values were obtained in this country in cattle clinically normal. Several methods were analytically studied and finally it was adopted that of Scarisbrich, to which some modifications were introduced.

It was determined the most convenient lapse of time for the extraction of the sample from the beginning of the ingestion, which was estimated at 120'.

Average values of Total Volatile Fatty Acids of 0,546 g ‰ were obtained (expressed in Acetic Acid) with a variation of approximately $\pm 0,037$. As a complement, a succinct physiological and biochemical narration of the paunch or first stomach is made and also of the fermentative processes in it, as well as the metabolism of the above mentioned Volatile Fatty Acids.

(*) Resumen de la tesis para optar al Título de Dr. en Ciencias Veterinarias.

(1) Jefe de Trabajos Prácticos de la Cátedra de Química Biológica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

ANTECEDENTES

A pesar de la gran importancia de los ácidos grasos volátiles (A.G.V.) del rúmen para estos mamíferos, que hace que la determinación de ellos deba realizarse con bastante asiduidad, no ha ocupado la atención necesaria como para que se cuente en el Laboratorio Veterinario, y especialmente en Producción Animal, con métodos de fácil acceso, simple ejecución y resultados satisfactorios.

Desde el método dado inicialmente por Brown en 1950, por valoración directa de aquellos, hasta los más efectivos que aplican la cromatografía en fase gaseosa (Jaimes y Martín, 1952; Emery y Koerner, 1961, aplicado por Erwin al contenido ruminal, etc.), se han postulado algunos que no tuvieron trascendencia, como el de Scarisbrich en 1952; el de Hunter, 1960, e incluso por fotometría de llama en fase acuosa.

MATERIAL Y METODO

El método que utilizamos para hacer la determinación de los Ácidos Grasos Volátiles del contenido ruminal, es una modificación del método original de Scarisbrich

El método del citado autor es sencillo: liberación de los ácidos grasos volátiles totales de la muestra a un pH determinado; arrastre por corriente de vapor y finalmente valoración por alcalimetría, previa recolección en H₂O destilada neutralizada y privada de CO₂.

Hemos juzgado que este método podría satisfacer las finalidades que buscamos: es de fácil acceso en cualquier Laboratorio Veterinario, rápido y su ejecución repetible en forma seriada sin mayores inconvenientes. No exige, por otra parte, aparatos costosos ni especiales.

Con el fin de agilizarlo aún más y darle, a nuestro juicio, mayor fidelidad en los resultados, hemos estudiado algunas variantes que redundarían en aquellos beneficios.

El método de Scarisbrich da una acidez determinada al medio con el fin de liberar los Ácidos Grasos Volátiles Totales, mediante una solución buffer de ácido oxálico-oxalato de sodio.

Una de las modificaciones que introducimos incide sobre este primer paso del método, en efecto: la acidificación del medio la hacemos con solución de H₂SO₄ (D: 1,84) diluido al 10 % en agua destilada (V/V). Y lo hacemos basados en que aplicamos un tratamiento previo a la muestra con MgSO₄ · 7 H₂O, como en el primer paso del método de Jaimes y Martín.

Luego se hace una destilación por arrastre en corriente de vapor y se recoge el destilado sobre un volumen exactamente medido de solución de NaOH de título conocido, adicionado de unas gotas de indicador.

El autor emplea en la titulación rojo de fenol, pero no hay inconveniente en emplear otro indicador bicoloreado cuya zona útil de viraje se encuentre en ese pH.

No atendemos a la exclusión del CO₂ en el sistema colector en razón de que la recolección del destilado la hacemos directamente sobre la solución alcalina valorada.

Conforme a lo expresado estudiamos una adaptación del método en cuestión, que, como lo probaremos más adelante, ha dado resulta-

dos satisfactorios. Detallamos a continuación las variantes que proponemos y hemos seguido en la parte experimental:

Método Propuesto

Aclaremos que se determinan **ACIDOS GRASOS VOLATILES TOTALES**, que se expresarán en Acido Acético.

A) Reactivos

- 1) Sulfato de magnesio cristalizado p.a. ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$).
- 2) Acido sulfúrico concentrado p.a. (Densidad: 1,84), diluido al 10 % en agua destilada (V/V).
- 3) Solución Normal de NaOH.
- 4) Solución Normal de HCl.
- 5) Solución de indicador rojo de fenol.
- 6) Papel indicador de pH.
- 7) Oxido de calcio anhidro p.a.

B) Material

- 1) Balón de vidrio Pyrex, de aproximadamente 2 litros.
- 2) Balón de destilación de vidrio Pyrex, de un volumen de 1-1,5 litros.
- 3) Tubos de centrífuga grandes.
- 4) Erlenmeyer de vidrio Pyrex de volumen de 500 ml. aproximadamente.

- 5) Pipetas y buretas controladas.
- 6) Papel de filtro de buena calidad.
- 7) Embudos adecuados.
- 8) Tubos de vidrio para conexiones.
- 9) Trompa de agua para vacío.
- 10) Gasa de cirugía.

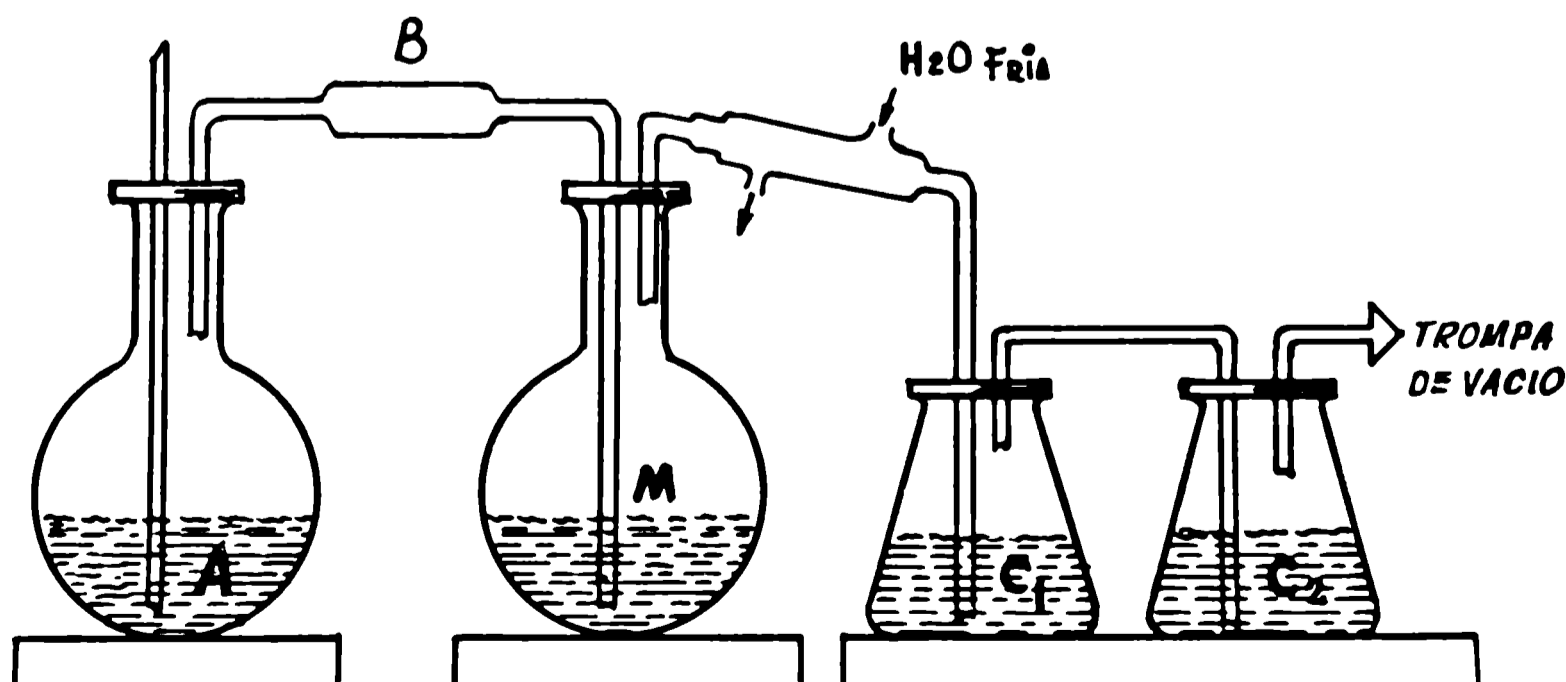
Técnica

Extraído el contenido ruminal, se mezcla y se filtra por gasa (de cirugía) para que retenga las partículas mayores.

Se toman (en recipiente adecuado marcado a 150 ml. ú otro volumen según convenga) 100 ml de la muestra (u otra cantidad) y se le agregan 100 g. de sulfato de magnesio hidratado, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Se mezcla hasta disolución de la droga. Se acidifica con solución de H_2SO_4 (reactivo N° 2), gota a gota hasta pH oscilante entre 2 y 3 (determinado con "papel indicador"). Se mezcla bien, evitando la formación de demasiada espuma.

Se lleva durante 20 minutos aproximadamente a una temperatura entre $4^{\circ}C$ y $8^{\circ}C$. Con ello se reduce la espuma y luego se completa a volumen y se mezcla. Se filtra o mejor se centrifuga.

Se toma una parte alícuota del filtrado o centrifugado que se coloca en el balón de destilación M del aparato según el esquema que se ilustra. Puede agregarse I-II gotas de H_2SO_4 concentrado.



En el sistema A, generador de vapor de agua, se coloca en un balón de 2 litros, H₂O destilada ligeramente acidulada con H₂SO₄, para retener NH₃ y el vapor de agua filtra a través de CaO.

En el sistema colector se coloca: en C₁: 5 ml. de NaOH N.; 5 ml. de agua destilada y unas gotas de solución de indicador rojo de fenol; y en C₂: 2 ml. de solución de NaOH N, 5-8 ml. de agua destilada y unas gotas del indicador. Este segundo sistema colector funciona como de seguridad, para evitar pérdidas de Acidos Grasos Volátiles. La conexión final va a la trompa de vacío (trompa de agua) para efectuar una suave aspiración.

Deberá verificarse que todo el sistema no tenga pérdidas.

Recordemos que en C₁ y en C₂ el indicador deberá señalar durante toda la operación un medio alcalino (color rojo).

Si virara en C₁ hacia el ácido (color amarillo), significaría que la cantidad de solución de Na.OH N.colocada fue insuficiente para fijar los Acidos Grasos Volátiles liberados; pero serán retenidos en C₂.

Si en C₂ hubiera viraje del indicador, la operación quedaría invalidada.

Es correcto que en C₁ no haya viraje del indicador hacia el lado ácido. El sistema C₂ es solo a efectos de retener el posible pasaje de pequeñas porciones de Acidos Grasos Volátiles, por demasiada aspiración, rapidez de destilación o excesivo calentamiento.

El autor habla de recolección de de 80 ml. de destilado; nosotros damos por terminada la operación a los 30 minutos aproximadamente, de acuerdo a los ensayos realizados, pues hemos comprobado que en dicho lapso se ha arrastrado la totalidad de los Acidos Grasos Volátiles de la muestra.

El burbujeo del vapor de agua en M deberá ser continuado pero no violento lo mismo que la aspiración.

El sistema generador A, no podrá estar próximo al balón M, para evitar el calentamiento de la muestra, que podría ocasionar errores por su descomposición o excesiva volatilización de los ácidos grasos volátiles, que escaparían a su fijación en los sistemas colectores.

Terminada la destilación se restituye la temperatura; se retiran los sistemas colectores C₁ y C₂ previo lavado con agua destilada de los extremos de los tubitos de transporte del destilado que pescaban en las soluciones respectivas y se valora separadamente con solución N. de HCl la cantidad de solución N. de NaOH que queda libre en C₁ y C₂.

De allí: ml. de solución N. de NaOH colocados menos ml. de NaOH N. remanentes, darán los ml. de NaOH N. combinados.

En C₂ no debe dar NaOH N. combinado, si acaso diera (generalmente hemos encontrado una pequeñísima fracción), se suma a la hallada en C₁. Y por lo tanto (dando el valor de los Acidos Grasos Volátiles Totales en Acido Acético, peso molecular 60), se tendrá:

$$\text{ml. de NaOH N. combinados} \times 0,060 \times \frac{100}{\text{ml. de contenido ruminal tomados para la valoración}}$$

GRAMOS DE ACIDOS GRASOS VOLATILES (expresados en Acido Acético) % de Contenido Ruminal.

Tomemos por ejemplo, una de las determinaciones efectuadas: Se tomaron 100 ml. de contenido ruminal, se le agregaron 100 gramos de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ que se disolvieron mezclando suavemente. Se acidificó con solución de H_2SO_4 al 10 % hasta pH de 2 a 3. Se mezcló bien evitando espuma. Se dejó 20 minutos aproximadamente en heladera a $5^\circ C$. Se retiró luego, se dejó unos momentos a temperatura ambiente, se completó a volumen de 150 ml. y se mezcló bien. Luego se centrifugó.

Se colocaron en M, 50 ml. (exactamente medidos) del líquido centrifugado que corresponden a 33,33 ml. de contenido ruminal. Se agregó 11 gotas de H_2SO_4 concentrado.

En los sistemas colectores se colocó: en C_1 , 5 ml. de solución N. de NaOH y en C_2 , 2 ml. de la misma solución; en ambos unas gotas de solución del indicador rojo de fenol y unos 5 ml. de agua destilada.

Se completó el aparato conforme a lo detallado.

Se procedió a la destilación por arrastre durante 30 minutos. Terminada ella, se desconectó el sistema, se lavaron con agua destilada los tu-

bos de desprendimiento que pescan en la solución de NaOH y se procedió a la titulación de la cantidad de solución de NaOH N. que quedó libre.

Este paso de la operación puede practicarse en dos formas:

1) Se vierte el contenido de C_2 en C_1 , se lava 2-3 veces con unos pocos ml. de agua destilada el colector C_2 que se reúnen con el de C_1 y luego se titula el total. Es decir: en C_1 había 5 ml. de NaOH N. y en C_2 , 2 ml., en total 7 ml. de solución N. de NaOH. Se consumieron en la titulación 5 ml. de HCl N. En consecuencia se combinaron 2 ml. de NaOH N. y por lo tanto:

$2 \times 0,060: 0,12$ gr. de Ácidos Grasos Volátiles Totales en la muestra, y como se tomaron 33,33 ml. de contenido ruminal, para llevar a % se tendrá:

$$0,12 \times \frac{100}{33,33} : 0,36 \text{ gr. de A.G.}$$

V.T. en 100 ml. de contenido ruminal (expresado en ác. acético).

2) Se hace la titulación separadamente en cada colector, C_1 y C_2 , y ambos resultados finales se reúnen. Y en este caso se tendría:

En C_1 5 ml. de NaOH N. y se consumieron 3,2 ml. de HCl N., luego se combinaron: $5 - 3,2: 1,8$ ml. de NaOH N.

$$1,8 \times 0,060: 0,108 \text{ gr. de A.G.V.T. (en } C_1)$$

En C_2 había 2 ml. de NaOH N. y se consumieron 1,8 ml. de HCl N., por lo tanto se combinaron: $2 - 1,8: 0,2$ ml. de NaOH N.

$$0,2 \times 0,060: 0,012 \text{ gr. de A.G.V.T. (en } C_2)$$

Finalmente

$0,108 + 0,012: 0,120$ gr. de A.G.V.T. en los 33,33 ml. de contenido ruminal de la muestra; por lo tanto

$$0,120 \times \frac{100}{33,33} : 0,36 \text{ gr. de A.G.V.T. \% de contenido ruminal (expresado en ácido acético).}$$

Parte Experimental

La experimentación la realizaremos en dos partes:

- A) Ensayos de recuperación.
- B) Determinaciones de A.G.V.T. en contenido ruminal de bovinos clínicamente normales.

A) Ensayos de Recuperación

Para constatar la bondad del método que hemos detallado se efectuaron algunos “Ensayos de recuperación” en ambos sentidos:

a) con soluciones puras de Acidos Grasos Volátiles (Acido fórmico, ácido acético, ácido butírico).

Se prepararon soluciones puras de ácido fórmico, ácido acético y ácido butírico (p.a.) al 3, al 6 y 8,8 0/o respectivamente en agua destilada.

Se emplearon en las determinaciones las cantidades que se señalan a continuación y se practicó el método siguiendo todos los pasos de la técnica que se propone y se obtuvieron los siguientes resultados:

MUESTRA	ACIDO FORMICO	ACIDO ACETICO	ACIDO BUTIRICO	EXPRESADO EN ACETICO	HALLADO EN ACETICO	RECUPERACION
1	1 ml.	1 ml.	1 ml.	0,18	0,17	94,4 0/o
2	2 ml.	2 ml.	2 ml.	0,36	0,354	98,4 0/o
3	3 ml.	3 ml.	3 ml.	0,54	0,546	101,1 0/o

MEDIA: 98 0/o

Es decir, se ha obtenido una recuperación del 98 0/o ($\pm 2,03$), que la consideración aceptable desde el punto de vista práctico en su aplicación a la Medicina Veterinaria.

- b) Con contenido ruminal adicionado de Acido Acético en cantidad conocida.

Se extrajo contenido ruminal, se homogeneizó bien y se tomaron dos partes alícuotas de 50 ml. cada una

rotuladas M_1 y M_2 .

A la muestra M_2 se le adicionaron 5 ml. de solución N. de ácido acético p.a. (peso molecular 60) y se mezcló perfectamente.

Sobre ambas muestras separadamente se practicó la determinación de los Acidos Grasos Volátiles Totales (A.G.V.T.) conforme al método detallado.

ENSAYOS DE RECUPERACION

Cuadro Nº 1

VALORES DE A.G.V.T. EN GRAMOS % EXPRESADOS EN ACIDO ACETICO

MUESTRA	A. G. V. T. INICIAL M ₁	AC. ACETICO AGREGADO	VALOR TEORICO	VALOR HALLADO M ₂	RECUPERACION %
1	0,324	0,300	0,624	0,622	99,6
2	0,264	0,300	0,564	0,526	93,0
3	0,440	0,300	0,740	0,722	97,1
4	0,420	0,300	0,720	0,710	98,6
5	0,360	0,300	0,660	0,650	98,5
6	0,276	0,300	0,576	0,575	99,8
7	0,352	0,300	0,652	0,650	99,7
8	0,420	0,300	0,720	0,724	100,5
MEDIA:					98,4 %

Con los resultados expresados, consideramos que una recuperación del 98,4 % ($\pm 1,75$) es totalmente aceptable.

Por lo tanto entendemos que el método que estudiamos satisface ampliamente las necesidades de nuestra profesión y, por otra parte, es de sencilla ejecución, rápido y no requiere aparatos especiales ni costosos, siendo por lo tanto de utilización accesible en el Laboratorio Veterinario.

B) Determinación de A.G.V.T. en contenido ruminal de bovinos clínicamente normales.

Hemos trabajado con bovinos de

3 a 4 años de edad, sin distinción de raza ni sexo (hembras libres), clínicamente sanos, bajo control de la Cátedra de Clínica de Grandes Animales de esta Facultad.

En primer término se determinó el tiempo óptimo de extracción del contenido ruminal a partir de la ingesta, para lo cual se realizó una extracción en ayunas y luego a los 60, 120 y 180 minutos de la ingestión de alimentos y se practicó la determinación de los A.G.V.T. en cada una de dichas muestras, siguiendo el método expuesto.

Los resultados van expresados en el cuadro Nº 2.

De su estudio se deduce que la toma de muestra habrá de hacerse a los 120 minutos aproximadamente de la ingesta.

Cuadro N° 2

**DETERMINACION DEL TIEMPO DE EXTRACCION
 A.G.V.T. EN GRAMOS % DE CONTENIDO RUMINAL
 (EXPRESADO EN ACIDO ACETICO)**

MUESTRA	AYUNAS	60'	120'	180'
1	0,312	0,360	0,482	0,430
2	0,300	0,364	0,474	0,382
3	0,350	0,414	0,506	0,432
4	0,314	0,380	0,480	0,440
5	0,360	0,434	0,538	0,450
6	0,364	0,420	0,526	0,460
7	0,312	0,420	0,548	0,436
8	0,360	0,420	0,533	0,433
MEDIA	0,334	0,401	0,503	0,433
DESVIACION MEDIA	(± 0,023)	(± 0,025)	(± 0,022)	(± 0,013)

En segundo término, ya obtenido el tiempo de extracción del contenido ruminal, se han realizado las determinaciones en ayunas y en el lapso estipulado, siempre en análo-

gas condiciones, en bovinos clínicamente normales y con ración alimentaria similar en todos los casos. Los resultados están consignados en el cuadro N° 3.

Cuadro N° 3

**A.G.V.T. EN GRAMOS % DE CONTENIDO RUMINAL
 (EXPRESADO EN ACIDO ACETICO)**

CANTIDAD DE MUESTRAS	AYUNAS	120 MINUTOS	DIFERENCIA EN MAS
50	0,381 (± 0,0362)	0,546 (± 0,037)	0,164 (± 0,0147)

DISCUSION

De todos los métodos utilizados para la valoración de los Ácidos Grasos Volátiles Totales del Contenido Ruminal, sin duda el más aplicado hasta ahora, es el de cromatografía en fase gaseosa, que si bien da valores muy aceptables, incluso para cada uno de los ácidos grasos volátiles, adolece de algunos inconvenientes. En primer término, el aparato en si mismo, en el doble aspecto de su costo y de su manejo.

Por otra parte, es necesario considerar las causas de error inherentes a la ejecución del método, por ejemplo: la extracción y esterificación previa (Verbeck, etc.) y la destilación en corriente de vapor (Fenner) que será menester salvarlas para que los resultados obtenidos sean fieles.

Todavía más: según Molinari y Zahut escaparía a la valoración el ácido fórmico, que lo soluciona defecando la muestra con sal mercúrica. Además, la técnica del método consume demasiado tiempo.

No obstante es el más aplicado. Aún así, no resulta de aplicación accesible en el trabajo de rutina en un Laboratorio Veterinario, especialmente para Producción Animal donde deben hacerse determinaciones seriadas.

Podría serlo el método indirecto de Hunter y colaboradores basado en la combustión de los ácidos grasos volátiles totales liberados y luego valoración del CO₂ obtenido por combustión de aquellos. Requeriría la medición de volúmenes gaseosos o la fijación de ellos, lo cual le restaría agilidad en la utilización que estudiamos.

Incluso la determinación por Fotometría de llama en fase acuosa, método sencillo, sensible y de fácil acceso, que no ha entrado en la práctica corriente.

El método de Scarisbrich es sencillo: liberación de los ácidos grasos volátiles totales de la muestra a un pH determinado; arrastre por corriente de vapor y finalmente valoración por alcalimetría, previa recolección en H₂O destilada neutralizada y privada de CO₂.

Este método, con las variantes introducidas, que, a nuestro juicio, a la vez que lo agilizan aún más le dan mayor fidelidad en los resultados, reúne los requisitos indispensables, ya que las determinaciones se realizan en forma relativamente rápida y pueden hacerse en el Laboratorio Veterinario en forma seriada, no exigiendo aparatos costosos ni especiales.

CONCLUSIONES

Conforme a todo lo expuesto presentamos las siguientes conclusiones:

- 1) El método de Scarisbrich, con las variantes introducidas, da resultados satisfactorios para nuestra profesión.
- 2) El valor medio de los Ácidos Grasos Volátiles Totales, en el

contenido ruminal de bovinos normales, en nuestro medio, extraído a los 120 minutos de la ingesta es de 0,546 g ‰ (expresado en ácido acético) con variación de $\pm 0,037$.

Todo ello en las condiciones y con los métodos expuestos en el presente trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Annison, H. F.* Biochem. J., 1956, 64
- Annison, H. F., Hill, K. F. y Lewis, D.* Biochem. J., 1957, 66.
- ASL, R. W. y Dobson, A. J.* Physiol., 1963, 39.
- Arroyo, V.* (Citado por Gallo, 1963).
- Avellini, H.* (Citado por Gallo, 1963)
- Baglioni, T. y colab.* Riv. Zoot. Agr. Vet.; 1966, 5.
- Baker, F.* Nature, 1942, 149,220, 350,479.
- Baker, F.* (Citado por Spisni), 1952.
- Barcroff, J.* Exp. Biol. 1944, 20.
- Barsett, A. J. G. y Reid, R. L.* J. Agric. Sci., 1957, 48.
- Barsett, A. J. G. y Reid, R. L.* Reactions in the rumen, Ed. E. Arnold, London, 1961.
- Biavanti, F.* Zoot. Vet., Milán, Tomo XI, 1949.
- Blaxter, H. L.* J. Dairy Sci., 1956, 39.
- Bonsembiante, M.* Riv. Zootecn., 1955, 28, 81-85, 136-139, 171-174.
- Borgatti, G.* Atti Soc. It. Sci. Vet., 1948, 2, 186-221.
- Borgatti, G., Martini, E., Rowinski, P. y Usuelli, P.* "Fisiologia degli Animale Domestici", Bologna, Libreria Finerelli, 1956.
- Borgatti, G. y Matscher, R.* Arch. Sc. Biol., 1956, 40, 365-381, 382-397.
- Broberg, G.* Nord. Vet. Med., 1957, 9, 57-60.
- Brown.* 1950 (Citado por Seren, 1966).
- Bruni, A. C. y Zimmerl, U.* Anatomia degli Animali Domestici, Milano, Ed. Vallardi, 1957.
- Buiatti, P. G.* Riv. Zootecn., 1958, 31, 108-111.
- Calkins.* 1938 (Citado por De Vuyst y Vambelle, 1955).
- Cappa, V.* Clin. Veter., 1955, 78, 176-179.
- Cappa, V.* Riv. Zootecn., 1958, 31, 199-200.
- Carroll, E. J., Hungate, R. E.* App. Microbiol., 1954, 2, 105-207
- Cescon, I., Brambilla, E., Pagani, G., Piccinini, S.* Atta della Soc. It. della Sc. Vet., 1965, Vol. XIX.
- Cescon, I.* Atta della Soc. It. della Sc. Vet., 1967, Vol. XXI.
- Clark, C. J.* Amer. Jour. Vet. Res., 1953, 14, 376-384.
- Clark, C. H.* Vet. Med., 1953, 48, 129-131.
- Clark, R.* Jour. South Afr. Vet. Med. Ass., 1965, 26, 217-220.
- Clark, R. y Weiss, K. E.* Jour. South Afr. Vet. Med. Ass., 1956, 27, 79-104.
- Cole, H. H., Mead, S. W. y Kleiber, M.* 1942 (Citado por Gilchrst y Clark, 1957).
- Cowie, A. T. y coll.* 1951 (Citado por Curto 1955-1956).
- Curto, G. H.* Zootecnia e Vet., 1965, 10, 437-450, y 1956, 11, 4-18.
- De Vuyst, A. y Vambelle, M.* Ann. Med. Vetér., 1965, 99, 71-120.
- Dougherty, R. W. y Meredith C. D.* Amer J. Vet. Res.: 1950, 115-183.
- Dukes, M. M.* "The Physiology of Domestic Animals" New York, Comstock Publ. Ass. 7a. Ed., 1965.
- Dukes, M. M. y Sampson, I.* Cornell Vet. 1937, 27, 130-140 (Citado por Brunaud y Dussardier, 1953).
- Duncan, R. E. B., Porteo J. S. J.* Analyst, 1953, 78.
- Elsden, S. R.* Biochem, J. 1946, 40.
- Elsden, S. R.* J. Exp. Biol., 1946, 22.
- Emery, E. M., Koenner, W. E.* Anal. Chem., 1961, 33.
- Elleberger, W.* (Citado por Borgatti y coll., 1956).
- Fenner, H., Elliot, J. M. J.* Animal Sci., 1963, 22.
- Filotto, U., Negri, N., y Miraval, F.* Atti Soc. it. Sci. vet., 1956, 10.
- Fina, L. R., Teresa, G. W., Bartley, E. E. J.* Anim. Sci., 1958, 18, 666-667.
- Folley, S. J. y French, T. H.* (Citado por Curto, 1955-1956).
- Gallo, G. G.* "Fisiología, Semiología, Propedéutica y Principales Enfermedades de los Proventrículos y Estómago Verdadero de los Rumiantes, 1963, 9-14.
- Gehere, C. H., Lankin, W. E.* J. Agr. Food., Chem., 1961, 9.
- Gilchrist, F. M. C. y Clark, R. J.* South Afr. Vet. med. Ass., 1967, 28.
- Giulio, Ludovico,* Arch. Vet. It., 1957, Vol.VIII, Nº 2.
- Gray, F. V.* J. Exp. Biol., 1947, 24.
- Guichandut, J. J.* Elementos de Zootecnia General. Edición Centro de Estudiantes Medicina Veterinaria, La Plata. Tomo I, 1966.
- Habel, R. E.* Cornell Vet., 1956, 46, 555-558.
- Hale, J. H., y coll.* 1947 (Citado por Borgatti y coll., 1956).
- Hill, K. J.* Physiology of digestion in the ruminants. Ed. Butharorths, London, 1965, 221-223.
- Hoflund, S.* "Untersuchungen uber Storungen in den Funktionen derwie derkavermagen, durch Schadigungen des N. Vagus verursacht", Stockholm, J. Marcus, 1940.
- Holtenius, P. Bjorck, G., y Hoflund, S.* Dtsche. tier. Wschr., 1959, 66, 554.
- Hunter, I. R., Pence, J. W.* J. Food Sc., 1961, 26.

- James, A. T. y Martin, A. J. P.* Biochem, J., 1952, 50.
- Keeney, M.* Agric. Exp. Saint Maryland Misc. Publ. Nº 238, 1955.
- Mangold, E., y Usuelli, F.* Wiss. Arch. Landw., 1930, Abt. 3,2, 190.
- Marklan, R.* Biochem. J., 1942, 36
- Marston, H. R.* Biochem. J., 1948, 42.
- Masson, M. J., Phillipson, A. T.* J. Physiol., 1951, 13.
- Mc Donald, P., Edwards, R. A., Greenhalgh, I. F. D.* Nutrición Animal, Ed. Acribia, Zaragoza (España), 1969.
- Meyer Jones, L.* "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", Ames, Iowa. The Iowa State Coll. Presse., 2a. Ed., 1957.
- Molinari, A. y Zahut, J.* Clin. Vet. (Milán-Italia), 1964, Vol. 87.
- Phillipson, A. T.* J. exp. Physiol., 1952, 116, 84-86.
- Rails, J. W.* Anal. Chem., 1960, 32.
- Re, A.* Vet. ital., 1957, 8, 453-458.
- Renzoni, A.* Arch. ital. ana. embriol., 1956, 61, 17-33.
- Scarisbrich, D.* Biochem, J., 1952, 50, XXXIV.
- Seren, E.* Enfermedades de los estómagos de los bóvidos, Tomo I, Ed. Acribia, Zaragoza (España), 1966.
- Sisson, S. y Grossman, J. D.* "The anatomy of the Domestic Animals", Philadelphia, Saunders Co., 1950.
- Slaw, J.* Rev. vet. Venezolana, Caracas (Venezuela), 1963, Nº 88.
- Usuelli, F.* Clin. veter., 1930, 53, 543-570, 625-645, 787-805.
- Usuelli, F.* Profilassi, 1933, 6, 7-14.
- Usuelli, F. y Fiorini, P.* Boll. Soc. it. bio. sper., 1937, 13, 1.
- Vorbeck, M. L. y colb.* Nature, 1960, 20.
- Weiss, K. E. Onderstepoort, J.* Vet. Res., 1953, 26, 251-253.
- Wester, J. 1929* (Citado por Brunaud y Dussardier, 1953).
- Wester, J. 1929* (Citado por Habel, 1956).
- Williams, E. I.* Vet. Rec., 1955, 67, 907-911.
- Wirth, D. 1934* (Citado por Gerosa y Borelli, 1935).