

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**“EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE SUBPRODUCTOS DE *Brassica
carinata* EN BOVINOS”**

“por”

**Manuel GINI CAPORALE
Ignacio COLLAZO SOSA
Jonatan PAIVA VICHI**

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2016**

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Alejandra Capelli

Segundo miembro:

Dra. Lourdes Adrien

Tercer miembro:

Dr. Javier García

Cuarto miembro

Dr. Rodolfo Rivero

Fecha:

21 de noviembre de 2016

Autores:

Br. Jonatan Paiva

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en primer lugar a nuestra casa de estudio, la Facultad de Veterinaria, por estos años de enseñanza y por formarnos en esta linda y grata profesión.

A nuestra tutora Dra. Lourdes Adrien, por su incondicional apoyo, por brindarnos todos sus conocimientos y por iniciarnos en el camino de la investigación y la extensión universitaria.

Al Laboratorio DILAVE Paysandú, quien nos brindó los materiales de laboratorio necesarios y donde se realizaron la necropsia de los animales, especialmente al Dr. Rodolfo Rivero por capacitarnos y orientarnos en la realización de este trabajo. También al resto del equipo.

Al Sr. José Pedro Lemes y a la Dra. María Noel Rodríguez por el aporte de información para éste trabajo.

A nuestras familias y amigos por acompañarnos en este camino.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....	VI
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY.....	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1. Descripción del sector lechero uruguayo:.....	12
4.2. Alimentación de la vaca lechera.....	13
4.2.2. Subproductos de la agroindustria:.....	14
4.2.3. Subproductos de origen Animal.....	14
4.2.4. Subproductos de origen Vegetal.....	14
4.3. Plantas del género <i>Brassica</i>	16
4.3.1. Características de la familia <i>Brassicaceae</i>	16
4.3.2. Importancia económica de las <i>Brassicaceae</i>	16
4.3.3. Componentes toxicológicos de las <i>Brassicaceae</i>	18
6.1. Objetivo General:.....	21
6.2. Objetivos específicos:.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.2. Experimento 2.....	26
8.1. Reproducción experimental.....	30
8.1.1. Experimento 1.....	30
8.1.2. Experimento 2.....	38
9. DISCUSIÓN.....	44
10. CONCLUSIONES.....	49
11. BIBLIOGRAFIA.....	50

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<u>FIGURAS</u>	Página
Figura 1. Ración comercial para terneros con la torta de <i>Brassica carinata</i>	23
Figura 2. Administración individual de la dosis correspondiente de <i>Brassica carinata</i>	24
Figura 3. Ruminocentesis.....	25
Figura 4. Tiras Reactivas.....	25
Figura 5. Medición del pH del líquido ruminal con peachimetro digital.....	26
Figura 6. Suplementación colectiva de Afrechillo de trigo.....	28
Figura 7. Resultados de la temperatura rectal de los terneros del experimento 1.....	30
Figura 8. Resultados de la frecuencia cardíaca de los terneros del experimento 1.....	31
Figura 9. Resultados de la frecuencia ruminal de los terneros del experimento 1.....	31
Figura 10. Resultados de la frecuencia respiratoria de los terneros del experimento 1.....	32
Figura 11. Resultados de los valores séricos de albumina de los terneros del experimento 1.....	33
Figura 12. Resultados de los valores séricos de proteínas totales de los terneros del experimento 1.....	33
Figura 13. Resultados de los valores séricos de urea de los terneros del experimento 1.....	34
Figura 14. Resultados de los valores séricos de NEFA de los terneros del experimento 1.....	34
Figura 15. Resultados de los valores séricos de colesterol de los terneros del experimento 1.....	35
Figura 16. Resultados de los valores séricos de creatinina de los terneros del experimento 1.....	35
Figura 17. Resultados de los valores séricos de GGT de los terneros del experimento 1.....	36
Figura 18. Resultados de los valores séricos de AST de los terneros del experimento 1.....	36
Figura 19. Resultados de los valores séricos de FAS de los terneros del experimento 1.....	36
Figura 20. Espectro de H-RMN de las muestras 1 y 2.....	39
Figura 21. Rumen del ternero 3732.....	40
Figura 22. Rumen del ternero 2820.....	40
Figura 23. Intestino delgado ternero 3732.....	41
Figura 24. Hígado con hepatomegalia.....	41

Figura 25. Riñones del ternero 3732	42
Figura 26. Riñones del ternero 2822.....	42
Figura 27. Ternero 2820. Corazón con áreas del miocardio en zona ventricular de coloración más pálida	43

TABLAS

Tabla 1. Experimento 1	23
Tabla 2. Tratamientos realizados	27
Tabla 3. Composición química de la <i>B. carinata</i> que se utilizó en el experimento 1.....	30
Tabla 4. Resultados de los estudios realizados en el liquido ruminal.....	37
Tabla 5. Composición química de la <i>B. carinata</i> que se utilizó en el experimento 2.....	38

1. RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar la toxicidad de *Brassica carinata* cuando es utilizada para la alimentación de bovinos. Para cumplir el objetivo se realizaron dos experimentos con el objetivo de reproducir el cuadro clínico que ocurrió en vacas lecheras que fueron suplementadas con la torta de *B. carinata*. Primeramente, se extrajo información epidemiológica del brote espontáneo para establecer la proporción de torta de *Brassica* que se utilizaría en los experimentos. En el experimento 1 se utilizaron 4 terneros machos castrados, de la raza Holando, de entre 4 y 5 meses de edad. La torta de *B. carinata* se administró en la relación por kg de peso vivo, que se utilizó en el establecimiento problema, teniendo en cuenta el peso de cada animal del experimento. Se administró durante 30 días. Tres terneros recibieron la torta de *B. carinata* y uno fue el animal control negativo, quien recibió la ración comercial y permaneció a pastoreo en su parcela. Las dosis utilizadas de la torta de *B. carinata* fue: 0g/kg (Control Negativo) y al 0,2% del peso vivo para los animales suplementados. Se registraron los parámetros clínicos durante los primeros 15 días del experimento y se extrajo sangre hasta el día 9 para la determinación de la concentración de enzimas hepáticas (GGT y AST, FAS), urea, creatinina, albúmina, proteínas totales, NEFA y colesterol. En el segundo experimento se utilizaron 15 novillos de la categoría de 1 a 2 años de edad, de la raza Holando, divididos en 3 grupos. Los tratamientos se realizaron de acuerdo a la dosis de *Brassica carinata* en base fresca (BF), administrada por animal. T1: 0 kg/BF, T2: 0,2 kg/BF, T3: 0,5 kg/BF de *B. carinata*. Los animales del experimento 1 no fueron afectados por el consumo de la *B. carinata*, no habiendo alteraciones clínicas, ni bioquímicas. Sin embargo, en el experimento 2, dos animales del T3 y un ternero del T2 murieron de forma aguda, en menos de 24 horas luego del primer día de consumo de la torta. Todos los terneros tenían lesiones similares con diversos grados de afectación. Las lesiones principales estaban restringidas al tracto digestivo, principalmente al rumen y retículo, donde se destacaba una ruminitis, con degeneración balonosa del epitelio ruminal con áreas de desprendimiento de la mucosa con necrosis. También había enteritis linfocitos eosinofílica difusa severa, edema perivascular en el sistema nervioso central y en dos animales una degeneración severa de los túbulos renales. Se concluye que la suplementación la torta de *B. carinata* determinó la muerte de los animales del experimento 2, no siendo posible confirmar cual fue el componente que generó tal cuadro. Teniendo en cuenta el tipo de subproducto no es posible descartar que tanto el contenido de grasas, como el tipo de ácidos grasos haya producido la intoxicación, así como otros compuestos liposolubles, no identificados. Se recomienda previa a la utilización de este tipo de subproducto la caracterización química de este tipo de componentes para poder incorporar estos alimentos a la dieta debido al rico contenido de proteínas y grasas.

2. SUMMARY

The aim of this research was to study the toxicity of the *Brassica carinata* in bovine feeding. Aiming to empirically prove if it is toxic to this animal species, two experiments were performed. First, epidemiological information was extracted from the spontaneous outbreak to establish the proportion of *Brassica* cake to be used in experiments. In the first experiment, four Holando breed castrated male calves were used, of around 4 – 5 months old, *B. carinata* was administered in the relationship kg-body weight, which was used in setting the problem, considering the weight of each test animal. It was administered for 30 days. Three calves started to be fed with the mentioned by-product combined with their regular diet, one of the calves did not consume the by-product. The doses were 0g/kg (negative control) and 0,2% of the live weight for supplemented animals. Clinical parameters were recorded during the first 15 days of the experiment and blood was taken until day 9 in order to determine the concentration of liver enzymes (GGT and AST, FAS), urea, creatinine, albumin, total protein, NEFA and cholesterol. In the second experiment, fifteen Holando castrated male bovines were used, of 1 and a half – 2 years old. They were randomly divided into three groups: T1: 0kg/BF, T2:0,2 kg/BF, and T3:0,5kg/BF of by-product. In the first experiment the by-product poisoning was not proved, and neither clinic symptoms were observed. In the second experiment three bovines died in less than 24 hours after the first day by-product was provided, proving the by-product poisoning. All calves had similar lesions with different degrees of involvement. The necropsy and histopathologic studies of the animals were carried out, the macroscopic and microscopy injuries were restricted to a digestive, hepatic, renal, and cardiac level. In conclusion, *B. Carinata* product poisoned animals from experiment two. Given the type of product you cannot put away that both the fat content and the type of fatty acid caused the poisoning, as well as other fat-soluble compounds, unidentified. It is recommended prior to use of this type of product, the chemical characterization of these components in order to incorporate these type of food into the diet due to the rich content of protein and fat.

3. INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción de leche exhiben un desbalance entre oferta y demanda de nutrientes. Este desbalance se intenta corregir con la suplementación con reservas forrajeras y concentrados, derivando en sistemas con niveles crecientes de complejidad operativa, requerimientos de infraestructura y fundamentalmente de precisión en el manejo de los recursos alimenticios (Meikle y col, 2013).

El objetivo principal de la suplementación es aumentar el consumo total de materia seca (MS) y el consumo de energía respecto de aquellos que se pueden alcanzar con sólo el pastoreo (Bargo y col, 2002; Bargo y col, 2003). Además de esto, se busca: a) Aumentar la producción de leche por vaca, b) Aumentar la carga y la producción de leche por unidad de superficie, c) Mejorar el uso de las praderas a través de mayores cargas, d) Aumentar el largo de las lactancias en épocas de producción de MS limitada y e) Aumentar el contenido de proteína en la leche a través de la suplementación energética (Bargo y col, 2003).

En los últimos años en Uruguay se ha incrementado el uso de subproductos derivados de la producción de biodiesel y de etanol, para la alimentación animal. El Biodiesel se define como ácido metilo o esteres etílicos de aceites vegetales, cuando son utilizados en motores diesel y sistemas de calefacción (Bouaid y col, 2005). La empresa Alcoholes del Uruguay (ALUR) produce y comercializa dos subproductos DDGS (granos secos de destilería con solubles) y WDGS (granos húmedos de destilería con solubles). Estos co-productos de destilería son extraídos del residuo de la obtención de etanol como biocombustible, a partir de diversos ingredientes ricos en almidón. Estos productos se recomiendan para la alimentación de ganado de carne y de leche. En ganado de leche se recomiendan por ser una excelente fuente de proteína, con más de 28% de materia seca, por ser una buena fuente de proteína no degradable en rumen, por su buena palatabilidad, entre otras características (ALUR, 2016).

Además de estos productos existen otras fuentes vegetales para la producción de Biodiesel que se utilizan a nivel mundial, especialmente en Europa, como son la *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Sinapis alba* y *Brassica carinata* (Bozzini y col, 2007). Esta última especie ha ingresado recientemente al país, importada por una empresa que produce Biodiesel para utilizarlo en el proceso industrial. Según los datos del Instituto Nacional de Semillas (INASE), la semilla de *B. carinata* ingresó en el año 2013, importándose 50 kg, luego en 2014 ingresaron 650 kg y por último en 2015 fueron 1000 kg de semilla (Ing. A. Gerardo Camps ,Gerente Evaluación y Registro de Cultivares, Comunicación personal INASE, Canelones).

La *B. carinata* también llamada "Mostaza etíope" es una especie oleaginosa del género *Brassica* perteneciente a la familia Brassicaceae (Crucíferas). Se encuentra emparentada con otras especies del género *Brassica* como son la colza (*B. napus*). Se considera una especie semi-salvaje y cuyas semillas

tienen un alto contenido de ácido erúxico y glucosinolatos, por lo tanto no se utiliza para la producción de aceite comestible.

Tiene su origen en Etiopía, donde deriva de los cruzamientos naturales de *B. nigra* × *B. oleracea* (Bozzini y col, 2007). Se presenta con grandes perspectivas como cultivo alternativo, ya que a partir del aceite de sus semillas se puede elaborar biodiesel, mientras que el resto de la planta produce biomasa que podría ser aprovechable con fines térmicos, por ejemplo, en el proceso de transesterificación durante el proceso de obtención del biodiesel (Falasca y Ulberich, 2010). Como biomasa los rendimientos obtenidos oscilan entre 6 y 8 toneladas por hectárea (Falasca y Ulberich, 2010).

Fuera de su lugar de origen, *B. carinata* presenta un enorme interés para la agricultura en zonas de clima semiárido, como lo demuestran estudios realizados a nivel mundial, debido a que presenta una mejor adaptación y comportamiento agronómico (Falasca y Ulberich, 2010). La *B. carinata* se adapta mejor, siendo superior desde el punto de vista productivo en condiciones adversas (suelos de arcilla, arenosos y en clima templado semiárido) cuando se compara con *B. napus* (Cardone y col. 2003). Esta productividad se debe principalmente a que posee: un sistema radicular más desarrollado que el de la colza, que le permite extraer agua de mayores profundidades; un desarrollo rápido y exuberante de materia verde en estado de roseta; ciclos de floración y maduración más largos; una mayor producción de frutos por unidad de superficie, debido a sus ramificaciones secundarias, terciarias y cuaternarias y a su resistencia a la dehiscencia de las silicuas, facilitando la cosecha y evitando el desgrane (Falasca y Ulberich, 2010).

A pesar de las potencialidades agronómicas anteriormente citadas, la “Mostaza etíope” no se cultiva a gran escala (Falasca y Ulberich, 2010). Los principales factores que limitan el desarrollo de su cultivo son la presencia de sustancias tóxicas en la semilla como el ácido erúxico, con más del 35% en el aceite y los glucosinolatos, en una concentración superior a 110 μ moles por gramo de semillas (Falasca y Ulberich, 2010).

En las especies del género *Brassica*, el aceite presenta elevada proporción de ácidos grasos de cadena larga: ácido eicosenoico (20:1) y ácido erúxico (22:1), (Falasca y Ulberich, 2010). Debido a la composición química de las semillas, esta *Brassica* presenta limitantes tanto para la producción de aceites para consumo humano como para los animales. Se ha descrito que el uso para alimentación animal está restringido por la presencia de glucosinolatos (Marilla y col, 2014). La composición química de su aceite, y por tanto de sus subproductos, hacen que su consumo sea cardiotóxico para animales y potencialmente tóxico para el ser humano (Falasca y Ulberich, 2010).

Sin embargo a pesar del contenido de glucosinolatos que suelen tener algunos materiales, por mejoramiento vegetal se han obtenido cultivares con niveles muy bajos de glucosinolatos, cuyas harinas no han causado ningún problema en vacas lecheras ni en terneros, aparte de un ligero incremento de tiocianato en la leche (Forraje Journal, 1997, citado por Fernández, 2014).

A pesar de las restricciones mencionadas en la bibliografía sobre el uso de esta especie para la alimentación animal, el sub-producto generado a partir de la extracción del aceite, llamado torta de canola, se comenzó a utilizar en la alimentación de rumiantes en nuestro país. El método de extracción del aceite utilizado en Uruguay es la extracción hidráulica, por presión de la semilla, se cocina al vapor y se extrae el aceite que se utiliza para la producción de Biodiesel. Este procesamiento se realizó en una empresa de la ciudad de Salto. El producto se comercializó a productores de Paysandú, especialmente a un productor lechero. Dicho producto se administró a las vacas en producción mezclado con la dieta que venían consumiendo los animales que estaba compuesta por soja peleteada, grano de maíz, ensilaje de maíz planta entera y pastoreo de soja. Al día siguiente de la administración de subproducto (asignación por animal: 0,5 kg para vacas primíparas/día y 1kg para vacas multíparas), mueren 5 vacas de las que habían recibido el producto. Esto ocurrió el 27 de enero de 2015.

A raíz de este problema, el productor consultó a la Médica Veterinaria encargada del predio y se ingresó el caso al Laboratorio Regional Noroeste del DILAVE, Paysandú. Se realizaron las necropsias y se remitió el material, pero los resultados no fueron concluyentes debido al grado de descomposición de los animales, por la alta temperatura ambiente de esos días de verano. Por estos motivos, y a raíz de interés del productor afectado y del Laboratorio se planteo realizar la reproducción experimental en bovinos para ver si el mismo fue la causa de la muerte de los animales, determinando si es viable o no la utilización del mismo en la alimentación de rumiantes.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. Descripción del sector lechero uruguayo:

Para Uruguay, el sector agropecuario siempre ha tenido una importancia económica y social estratégica, a la par de asegurar la soberanía alimentaria de su población, es un importante generador de trabajo y divisas para el país (Viera y col, 2013). Caracterizado por su especialización ganadera, durante el periodo 1900-2010 ha sufrido transformaciones en su estructura dejando espacio a otros rubros, que han ido ganando terreno como la agricultura, la forestación y la lechería (DIEA, 2015).

La lechería tuvo una serie de cambios de reorientación productiva, dando comienzo a una etapa de marcado dinamismo del sector, apoyado en la innovación y cambios técnicos en los distintos componentes del proceso productivo (genética, alimentación, sanidad, etc.), alcanzando en 2012 un volumen máximo histórico de aproximadamente 1.800 millones de litros ingresados a plantas pasteurizadoras (Duran, 2012).

El crecimiento de la fase pecuaria fue esencialmente de carácter vertical, se logra en el marco de una sostenida y prolongada trayectoria de caída en el número de productores lecheros, y en una menor superficie aplicada a la lechería, a partir de una importante mejora en productividad (OPYPA, 2014). En efecto, si se considera el año 1975 como punto de partida del proceso de cambio técnico, la producción de leche se multiplicó por tres en el año 2014 (DIEA, 2014).

La cuenca lechera del Uruguay se concentra en los departamentos de la región centro sur del país, existiendo además cuencas secundarias en torno a las ciudades más pobladas del interior del país (DIEA, 2014).

El subsector industrial de la lechería uruguayo está compuesto por unas 40 empresas, que cuentan con una capacidad de procesamiento de 9,5 millones de litros diarios y ocupa a unos 5000 trabajadores en forma directa. Sin embargo 5 empresas concentran el 85% del recibo lechero (Viera y col, 2013).

Un elemento característico del sector es que el sistema cooperativo capta el 71% de la producción, lo cual establece un diferencial con respecto a la región. De hecho, la Cooperativa Nacional de Productores de Leche (CONAPROLE) es la principal industria lechera del país, con un 65% de captación de la producción remitida y una de las empresas privadas más grande del Uruguay (Viera y col, 2013).

Del total de productores el 77% son remitentes, remitiendo unos 2014 millones de litros, con una producción de leche comercial que se aproxima a 2130 millones de litros, existiendo 3610 establecimientos lecheros de los cuales 2780 remiten, en cuanto al tamaño de las empresas, el 50% tiene menos de 100 Ha, menos de 70 Vaca Masa (VM) y produce menos de 700 litros/día. Son 14500 los trabajadores del sector primario, con una preponderancia de trabajadores

familiares. En cuanto a la tierra se mantiene la relación histórica, entre tierra y propiedad (47%) y tierra arrendada (42%) (INALE, 2014).

Los productos lácteos uruguayos llegan a más de 65 países. En el año 2012 se exportaron poco más de 245.000 toneladas de productos lácteos (principalmente leche en polvo y quesos) por un valor superior a los 785 millones de dólares, estas se encontraban relativamente concentradas en Brasil, Rusia, México y Cuba (INALE, 2014).

4.2. Alimentación de la vaca lechera

En la última década se ha observado una generalizada y creciente incorporación de la suplementación con granos, transformando la tradicional base “pastoril” de nuestra lechería (Errea y Souto, 2013,2014). El uso de suplementos (alimentos ricos en energía y/o proteínas) es particularmente importante para los animales lecheros, puesto que la producción de leche es un proceso de alto consumo de energía (FAO, 2016).

El objetivo principal de la suplementación es aumentar el consumo total de materia seca (MS) y el consumo de energía respecto de aquellos que se pueden alcanzar con solo el pastoreo (Bargo y col, 2002; Bargo y col, 2003). Además de esto, se busca: a) Aumentar la producción de leche por vaca, b) Aumentar la carga y la producción de leche por unidad de superficie, c) Mejorar el uso de la pradera a través de mayores cargas, d) Aumentar el largo de las lactancias en épocas de producción de materia seca limitada y e) Aumentar el contenido de proteína en la leche a través de la suplementación energética (Bargo y col, 2003).

El 60% de los suplementos son energéticos, con una preponderancia en los granos húmedos del sorgo (71%) frente al maíz (29%). La reserva forrajera usada mayoritariamente, proviene de los cultivos de verano (70%) y el resto de pasturas y verdeo de invierno. Dentro de los silos de planta entera de cultivo de verano, es mayoritario el sorgo (61%), en relación a maíz (37%) (INALE, 2014).

4.2.1. Subproductos utilizados en la alimentación animal

De la producción y procesamiento de alimentos para el hombre se originan numerosos subproductos y residuos que pueden ser destinados a la alimentación animal, un número importante de los mismos tienen características nutritivas diferentes según su origen y el tipo de procesos industrial (Castillo y Onetti, 2002).

Se llama también subproducto, al desecho de un proceso que se le puede sacar una segunda utilidad. No es un desecho en sí, porque no se elimina, se puede utilizar para otro proceso distinto (Fernández, 2008).

Las actividades agrícolas, ganaderas y la agroindustria generan constantemente residuos o subproductos orgánicos e inoocuos para la salud humana que pueden transformarse en proteína animal (carne o leche). Ésta transformación de los subproductos, de bajo costo, en un alimento de alto valor

biológico (carne o leche) para los seres humanos, permite aumentar la producción de carne o leche, para ser utilizado en la alimentación humana, siendo importante por el crecimiento de la población mundial. Además puede mejorar, significativamente, el resultado económico de los sistemas ganaderos, haciéndolo más sustentables en el tiempo. Y por último puede reducir los riesgos de contaminación ambiental al evitar que esos residuos o subproductos sean arrojados a las aguas (ríos, lagunas, mares), el suelo o el aire (Fernández Mayer, 2014).

4.2.2. Subproductos de la agroindustria:

Los precios de los alimentos proteicos en el mercado mundial se han elevado considerablemente, de ahí la necesidad cada vez mayor de cubrir los requerimientos nutritivos de los animales con recursos nacionales, en lo cual los subproductos juegan un papel fundamental (FAO, 2007). Los subproductos de la agroindustria presentan una amplia gama de calidad, con muy baja o alta energía. De tal forma resulta imperioso conocer tanto los aportes de energía digestible, proteínas y fibra efectiva de cada suplemento, como la estabilidad del alimento y las condiciones en que se debe conservar (Ojeda y Cáceres, 2002).

Dentro de los subproductos agroindustriales podremos encontrar subproductos de origen animal y subproductos de origen vegetal (Bauza, 2012):

4.2.3. Subproductos de origen Animal

Estos son derivados principalmente de tres industrias: frigorífica, pesquera y avícola (Bauza, 2012). Se deben tener en cuenta las siguientes consideraciones: a) Los subproductos de origen animal normalmente contienen importantes cantidades de grasa y son muy propensos a sufrir procesos de oxidación y rancidez. b) Deben ser procesados y almacenados adecuadamente para prevenir el crecimiento y contaminación con microorganismos. c) En general son comparativamente más caros que los subproductos de origen vegetal (INTA, 2002). En Uruguay el uso de raciones de subproductos de origen animal destinadas a rumiantes esta prohibido (Decreto 139/996 del 17 de Abril de 1996), debido a las medidas de prevención para evitar la introducción de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles en rumiantes, exótica para la ganadería uruguaya (IMPO, 1996).

4.2.4. Subproductos de origen Vegetal

Estos son derivados principalmente de cuatro industrias: cervecera, molinera, industria aceitera y de los biocombustibles (Bauza, 2012). Casi todos los vegetales que son producidos y/o procesados para la alimentación humana tienen algún subproducto que pueden ser utilizados para la alimentación animal. Estos subproductos son un importante componente en la elaboración de balanceados comerciales o en raciones elaboradas a campo (INTA, 2002).

De los subproductos de la industria molinera el más importante es el afrechillo; representa el pericarpio de la semilla y se obtiene en el proceso de separación del almidón. Son por su origen alimentos con altos contenidos de pared celular. Se caracterizan por aportar niveles altos de energía, debido a altas concentraciones de carbohidratos o de extracto etéreo (aceite) como en el caso del afrechillo de arroz (Gilles, 1993). Aunque el contenido de Ca y P puede ser bajo, son buenos suplementos en las dietas de vacas lecheras pudiendo participar en un 25 a 50% (INTA, 2002).

La industria aceitera utiliza distintas semillas de oleaginosas en la producción de aceite para consumo humano. De esta extracción queda el residuo que se incluye en los concentrados para animales. En general poseen un alto y buen nivel proteico y graso; dependiendo del método de extracción, el que contenga más o menos estas fracciones. Su uso depende de la palatabilidad, concentración de sustancias anti nutricionales y disponibilidad (Parsi et al, 2001). Se presentan en el comercio en forma de pellets o de harina. Actualmente, los pellets y las harinas más ampliamente utilizadas en el mundo provienen del procesamiento de la soja (INTA, 2002).

Los subproductos de las semillas de oleaginosas son las proteínas vegetales más ampliamente utilizadas en la alimentación animal, por su alto contenido de proteína, su amplia disponibilidad y su costo menor que otros subproductos (Preston y Leng, 2003).

La industria uruguaya es importadora de subproductos industriales especialmente fibras y proteínas de origen vegetal. Para el periodo 2008 a 2011 hay registrados permisos de importación por 53039 toneladas por año de afrechillo de trigo, 84449 toneladas año de harina de girasol, 32186 toneladas año de harina de soja y 113256 toneladas de residuos de soja (que no son harinas de soja) (ALUR, 2016).

En los últimos años en Uruguay, se ha incrementado el uso de subproductos derivados de la producción de biodiesel y etanol, para la alimentación animal. El biodiesel se define como ácido metílico o ésteres etílicos de aceites vegetales, cuando son utilizados en motores diesel y sistemas de calefacción (Bouiad y col, 2005). La empresa Alcoholes de Uruguay (ALUR) produce y comercializa dos subproductos DDGS (granos secos de destilería con solubles) y WDGS (granos húmedos de destilería con solubles). Estos subproductos de destilería son extraídos del residuo de la obtención del etanol como biocombustible, a partir de diversos ingredientes ricos en almidón. Estos productos se recomiendan para la alimentación del ganado de carne y leche. En ganado de leche se recomienda por ser una excelente fuente de proteína, con más de 28% de materia seca, por su buena palatabilidad, entre otras características (ALUR, 2016).

Además de estos productos existen otras fuentes vegetales para la producción de Biodiesel que se utilizan a nivel mundial, especialmente en Europa y Canadá, como son las *Brassica napus*, *Brassica oleracea*, *Brassica juncea*, *Brassica nigra*, *Sinapis alba* y *Brassica carinata* (Bozzini y col, 2007). Esta

última especie ha ingresado recientemente al país, importada por una empresa que produce biodiesel para utilizarlo en el proceso industrial.

4.3. Plantas del género *Brassica*

4.3.1. Características de la familia *Brassicaceae*

La familia *Cruciferae* (*Brassicaceae*) presenta 338 géneros y 3710 especies (Stevens, 2009). Esta familia botánica comprende especies originadas en zonas de clima templado, que están adaptadas a desarrollarse y crecer en zonas con temperaturas moderadas, lo que ha llevado a su cultivo en gran parte de países de Europa (Cabañas y col, 2005). Son plantas herbáceas con hojas alternas, simples, enteras o divididas, a veces en roseta basal. Las inflorescencias se presentan en racimos con flores hermafroditas, corola con pétalos libres y fruto en silicua o silícula. Esta familia es llamada así porque las flores de estas plantas poseen todas, cuatro sépalos y cuatro pétalos, colocados en forma de cruz. Casi todas las especies viven en campos y huertos, siendo muchas de ellas plantas arvenses. La familia *Brassicaceae* comprende numerosas especies que han sido utilizadas tradicionalmente por el hombre como hortícolas, forrajeras, o como fuente de condimentos y aceites. Es de gran importancia económica, con especies que presentan un aprovechamiento agrícola destacado como nabos, nabizas y grelos (*Brassica rapa*), mostaza negra (*Brassica nigra*), berza, repollo col asa de cántaro (*Brassica oleracea*), mostaza india (*Brassica juncea*), colza (*Brassica napus*), rábano (*Raphanus sativus*) y la mostaza etíope (*Brassica carinata*). Algunas de las especies presentan propiedades medicinales como la bolsa del pastor (*Capsella bursa-pastoris*), la rúcala (*Eruca vesicaria*), mostaza silvestre (*Sinapis arvensis*) y la mostaza blanca (*Sinapsis alba*) (Cabañas y col, 2005).

El consumo de las especies hortícolas de la familia, especialmente del género *Brassica*, ha ido aumentando en muchos países, al reconocerles a dichos productos importantes efectos benéficos en la salud de las personas, por ser alimentos ricos en fibra, en provitamina A, en vitamina C, en ciertos compuestos azufrados, antioxidantes y otros, lo que ayudaría en el retardo del envejecimiento celular, en prevención de ciertas enfermedades incluyendo cáncer (Murillo y Mehta, 2001)

Además de los usos anteriormente citados para los miembros de la crucíferas, diferentes estudios han puesto en manifiesto resultados prometedores en cuanto a utilización para la producción de biodiesel (Cardone y col, 2003), biofumigación (Kirkegaard y Sward, 1998), y recuperación de suelos contaminados por metales pesados (Nanda-Kumar y col, 1995).

4.3.2. Importancia económica de las *Brassicas*

A nivel mundial, el aceite que proviene del género *Brassica* constituye la tercera fuente de aceites vegetales, después del aceite de soja y palma, empleándose *B. rapa*, *napus*, *juncea* y *B. carinata*. Juntas totalizan a nivel mundial una superficie media anual que oscila entre 24 y 31 millones de

hectáreas en los últimos 5 años, con una producción anual de 37 a 50 millones de toneladas. La colza es la más importante, mientras que la mostaza etíope ocupa el último lugar (FAO, 2008).

Debido a la composición química de las semillas, esta *Brassica* presenta limitantes tanto para la producción de aceites para consumo humano como para los animales. Se ha descrito que el uso para alimentación animal está restringido por la presencia de glucosinolatos (Marilla y col, 2014). La composición química de su aceite, y por tanto de sus subproductos, hacen que su consumo sea cardiotóxico para animales y potencialmente tóxico para el ser humano (Falasca y Ulberich, 2010). En las especies del género *Brassica*, el aceite presenta elevada proporción de ácidos grasos de cadena larga: ácido eicosenoico (20:1) y ácido erúcido (22:1), (Falasca y Ulberich, 2010).

Brassica napus (colza, canola): el alto valor del grano, similar al del girasol, radica en la calidad del aceite comestible que produce, siendo este muy estable y de bajo contenido de ácidos grasos saturados (de los aceites vegetales el más bajo, 6%), también la harina que surge como subproducto para animales es de muy buena calidad y de alto contenido proteico (Alves, 2013). Posee un 36 a 37% de proteína de alto valor nutricional. Otro uso del aceite de la colza es la producción de biodiesel (ALUR, 2016).

El área sembrada de colza en Uruguay ha venido creciendo en gran forma en los años recientes. Según fuentes consultadas en la Dirección de Estadísticas Agropecuarias (DIEA), se trata de un cultivo “nuevo” en el país y no se comenzó a tener un registro individualizado del área sembrada hasta la encuesta agrícola invierno 2012, producto de su crecimiento. La siembra de la denominada “oleaginosa de invierno” había sido de 3000 hectáreas en 2010/2011, 6700 hectáreas en 2011/2012, alcanzando niveles de 26000 hectáreas de área sembrada para el periodo 2015/2016 con un rendimiento de 1500 kg/ha sembrada (DIEA, 2016).

Gran parte del crecimiento que ha tenido la colza se debe al impulso por parte de Alcoholes de Uruguay (ALUR) para la producción de biodiesel. Para obtener el combustible, se utilizan como materias primas la soja, colza y girasol, además de sebo vacuno. Según estimaciones de la propia institución, el 90% de la producción total de colza será industrializada por esta empresa (ALUR, 2015).

Brassica carinata es una especie de oleaginosa del género *Brassica* perteneciente a la familia Brassicaceae (Crucíferas). Se encuentra emparentada con otras especies del género como son la *B. napus* (colza). Se considera una especie semi-salvaje, cuyas semillas tienen un alto contenido de ácido erúcido y glucosinolatos. Esta especie, tiene su origen en Etiopía, donde deriva de los cruzamientos naturales de *B. nigra* por *B. oleraceae* (Bozzini y col, 2007). Se presenta con grandes perspectivas como cultivo alternativo, ya que a partir del aceite de sus semillas se puede elaborar biodiesel, mientras que el resto de la planta produce biomasa que podría ser aprovechable con fines térmicos, por ejemplo, en el proceso de trans-esterificación durante el

proceso de obtención del biodiesel (Falasca y Ulberich, 2010). Como biomasa los rendimientos obtenidos oscilan entre 6 y 8 toneladas por hectárea (Falasca y Ulberich, 2010).

Fuera de su lugar de origen presenta un enorme interés para la agricultura en zonas de clima semiárido, como lo demuestran estudios realizados a nivel mundial, debido a que presenta una mejor adaptación y comportamiento agronómico (Falasca y Ulberich, 2010). La *B. carinata* se adapta mejor, siendo superior desde el punto de vista productivo en condiciones adversas (suelos de arcilla, arenosos y en clima templado semiárido) cuando se compara con *B. napus* (Cardone y col, 2003). Esta productividad se debe principalmente a que posee: un sistema radicular más desarrollado que la colza, que le permite extraer agua de mayores profundidades; un desarrollo rápido y exuberante de materia verde en estado de roseta; ciclos de floración y maduración más largos; una mayor producción de frutos por unidad de superficie, debido a sus ramificaciones secundarias, terciarias y cuaternarias; y a su resistencia a la dehiscencia de las silicuas, facilitando la cosecha y evitando el desgrane (Falasca y Ulberich, 2010).

Mediante mejoramiento vegetal se ha logrado reducir estas propiedades indeseables de la planta. La presente invención se refiere a un aceite de semilla de mostaza etíope (nombre científico *Brassica carinata* A. Braun) carente de ácido erúico (menos de 2 % en peso respecto al contenido total en ácidos grasos del aceite) y con bajo contenido en ácido linolénico, entre el 1 % y el 7 % en peso del total de ácidos grasos. Este tipo de aceite no es producido en la naturaleza por plantas de mostaza etíope y ha sido obtenido mediante un procedimiento biotecnológico. El aceite de mostaza etíope carente de ácido erúico y con bajo contenido en ácido linolénico objeto de la presente invención es heredable y se produce siempre con independencia de las condiciones de cultivo (Bailon y col, 2002).

4.3.3. Componentes toxicológicos de las *Brassicas*

4.3.3.1. Glucosinolatos:

Los glucosinolatos son aniones orgánicos solubles en agua, que incluyen aproximadamente 120 compuestos cuya estructura química corresponde a ésteres β -tioglucosidos, N-hidroxisulfato o ésteres (Z)-N-hidroximinosulfato o S-glucopiranosil tiohidroximatos. Poseen un átomo de azufre unido a una β -D-glucopiranososa y una cadena lateral sobre el carbono α del grupo amino (Suzuki y col, 2006).

Son sustancias que se encuentran de forma natural en diferentes plantas y son parte de su mecanismo de defensa frente a los insectos herbívoros (Chen y Andreasson, 2001). Se encuentra principalmente en las especies Cruciferae, Brassicaceae (Wade y col, 2007).

Las diferencias en la estructura química de la cadena lateral son las que determinan la existencia de más de 120 glucosinolatos dentro de la familia

Cruciferae, siendo responsables de las diferentes propiedades bioquímicas de los mismos (Mithen, 2001).

Además de existir una gran variabilidad en número, hay especies que presentan un solo glucosinolato en su composición, mientras que otras poseen más de 30 diferentes, existe también una gran variabilidad en la concentración de dichos compuestos dentro de una misma especie, así como entre las distintas partes de la planta (raíces, tallo, hojas y semillas), o en función del estado fenológico y de los nutrientes disponibles (Bellotas y col, 2007).

Los glucosinolatos son los responsables del sabor picante de especias como la mostaza o los rábanos picantes. En algunos casos parecen ofrecer protección frente a algunos tipos de cáncer. Uno de los glucosinolatos naturales más abundantes es la sinigrina (Bones y Rossiter, 1996).

A partir de la extracción del aceite de las semillas de Brassica, se obtiene una harina rica en 40% de proteínas (Getinet y col, 1997). A pesar de que esta harina presenta una equilibrada composición de aminoácidos, el uso para alimentación animal está restringido por la presencia de glucosinolatos (Griffiths y col, 1998).

Aunque los glucosinolatos son inocuos, pero cuando son hidrolizados por la planta o por la enzima mirosinasa, el resultado es la producción de componentes potencialmente tóxicos como el isocianatos y nitrilos (Iqbal y col, 2008). Existen estudios en animales que indican estos productos de la hidrólisis tienen efecto bociogénico. Así se ha observado que tanto los isotiocianatos como tiocianatos tiene un efecto bociogénico indirecto, en tanto que si el isotiocianato se transforma a derivados de la oxazolidina-2-tiona, se obtienen productos que se denominan bociogénicos directos (Borgen y col, 2010).

Los signos clínicos comunes en la mayoría de las especies de animales tras la exposición a niveles tóxicos de glucosinolatos son: Alteración del metabolismo tiroideo y aumento en el tamaño de la glándula tiroidea, daño hepático (Elfving, 1980), irritación y necrosis local de la mucosa gastrointestinal, retraso del crecimiento, discapacidad locomotora, cambios en el comportamiento y desorientación (ELIKA, 2013).

Sin embargo a pesar del contenido de glucosinolatos que suelen tener algunos materiales, por mejoramiento vegetal se han obtenido cultivares con niveles muy bajos de glucosinolatos, cuyas harinas no han causado ningún problema en vacas lecheras ni en terneros, aparte de un ligero incremento de tiocianato en leche (Forraje Journal, 1997, citado por Fernández, 2014).

4.3.3.2. Ácido Erúcido:

El ácido erúcido es un ácido graso monoinsaturado del grupo de los omega-9, el mismo grupo al que pertenecen ácidos grasos como el oleico. Se encuentra en las semillas comestibles de las plantas de la familia Cruciferae, como la colza y la mostaza etíope. Puede constituir entre un 30 a 60% del contenido graso de

las semillas de las variedades tradicionales de colza (ACSA, 2015). Mientras su contenido en las variedades seleccionadas (canola) es menor al 2% (Bell, 1993).

La ingestión de grandes cantidades de este ácido graso se ha asociado a daño cardíaco y otros problemas de salud. Existen estudios en animales que relacionan la ingesta de altas cantidades de ácido erúcido con depósito de grasa en el miocardio (músculo cardíaco).

El contenido en ácido erúcido se convierte en un objetivo de mejora antagónico ya que por una parte son deseables aceites libres de ácido erúcido y por otra, prima la búsqueda de un alto contenido en ácido erúcido para fines industriales (Cartea y col, 2009).

Desde el punto de vista industrial, los aceites vegetales ricos en ácido erúcido se utilizan para la producción de lubricantes, plásticos y biodiesel (Green y Ramans, 1995).

5. HIPOTESIS:

El subproducto de *B. carinata* es tóxico para bovinos.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General:

Estudiar la toxicidad del subproducto de *B. carinata* cuando es utilizada para la alimentación de bovinos.

6.2. Objetivos específicos:

- 6.2.1. Determinar si el consumo de la torta de *B. carinata* produce signos clínicos cuando sea administrada a igual proporción que la administrada a las vacas que murieron en el brote natural.
- 6.2.2. Determinar alteraciones metabólicas y las lesiones macro y microscópicas producidas por el consumo de la torta de *B. carinata* cuando es administrada a igual proporción que la administrada a las vacas que murieron en el foco espontáneo.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Se extrajo información epidemiológica del caso sospechado como intoxicación natural por el subproducto de la *B. carinata* que fue evaluado en la tesis. Esta información fue obtenida en la visita al predio donde ocurrieron los problemas y con la entrevista con la Médica Veterinaria encargada y el propietario. Además se recabó información con el Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE Paysandú.

El trabajo experimental se realizó en la Estación Experimental “Dr. Mario A. Cassinoni” (EEMAC) de la Facultad de Agronomía, ubicada en el km 363 de la Ruta Nacional N°3 en el departamento de Paysandú, Uruguay.

El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión de Experimentación y Uso de Animales de la Facultad de Veterinaria, protocolo CEUAFVETPI115.

Se realizaron dos experimentos. El primer experimento se realizó para evaluar la toxicidad aguda y el segundo experimento para la toxicidad crónica del subproducto de la *B. carinata*.

La *B. carinata* utilizada en este trabajo, fue sembrada y cosechada por una empresa que trabaja en el rubro forestal y que perseguía como objetivo, extraer el aceite para la producción de Biodiesel. La semilla, una vez cosechada, fue llevada a la ciudad de Salto, a una planta extrusadora, donde toda la misma pasó por el mismo método de extracción del aceite. La metodología era basada en el prensado de la semilla, sin la utilización de solventes. En el primer experimento la torta utilizada provenía del predio comercial donde se había utilizado parte de ésta torta para alimentar vacas lecheras en producción y donde ocurrieron las muertes posteriores al consumo de la misma. En el segundo experimento, como se necesitaba mayor cantidad de torta por la cantidad de animales que se pretendía alimentar, fue provista por la empresa forestal que trajo directamente la torta desde la planta extrusadora.

7.1. Experimento 1

En el experimento 1, se utilizaron 4 terneros machos castrados, de la raza Holando, de entre 4 y 5 meses de edad. Diez días previos al inicio del ensayo se dosificaron con un antiparasitario, con el propósito de desparasitarlos para que no interfiera en los resultados futuros. Se colocaron en un mismo ambiente, en parcelas limpias (sin la presencia de plantas tóxicas) a base de campo natural mejorado y fueron adaptados a la alimentación con concentrado durante una semana. El concentrado utilizado fue una ración comercial para terneros, con 18% de proteína y se administró 1 kg de ración por animal/día.

La torta de *B. carinata* fue pesada y se administró en la misma dosis (misma relación por kg de peso vivo) que se utilizó en el establecimiento problema, teniendo en cuenta el peso de cada animal del experimento.

Los terneros se pesaron al inicio del ensayo. Se les ofreció el subproducto en comederos, de forma individual para cada uno de los terneros utilizados. En la

Tabla 1 se presentan la información de los terneros utilizados, la dosis y la duración del experimento.

Tabla 1. Experimento 1. Terneros utilizados, peso vivo, dosis de *Brassica carinata* en base fresca (BF) y duración de la administración.

Ternero	Peso Vivo	Dosis <i>B. carinata</i> (KgBF/animal/día)	Duración (Días)
2986	100	0	30
2984	93	0,19	30
2980	95	0,19	30
2987	110	0,22	30

Tres terneros recibieron la torta de *B. carinata* y uno fue el animal control negativo, quien recibió la ración comercial y permaneció a pastoreo en su parcela. Las dosis utilizada de la torta de *B. carinata* fue: 0g/kg (Control Negativo) y al 0,2% del peso vivo para los animales suplementados.

Debido a que no lo consumían espontáneamente, se decidió mezclar la *B. carinata* con el concentrado que venía consumiendo previamente (Fig. 1). La torta de *B. carinata* se les administró durante 30 días.



Figura 1. Ración comercial para terneros con la torta de *Brassica carinata* para ser mezclado y administrado a los terneros.

El suministro de la torta de *B. carinata* se realizó todo los días del experimento en la mañana, a partir de las 8:00 hs hasta que terminaban de consumir el producto.

Luego de ofrecida la mezcla, se observaba que cada animal la consumiera en su totalidad (Fig. 2). Luego permanecían en una parcela donde pastoreaban los cuatro terneros juntos una pradera de 3 años de Alfalfa (*Medicago sativa*). En la parcela contaban con agua *ad libitum*.



Figura 2. Administración individual de la dosis correspondiente de subproducto de *Brassica carinata*.

Se monitorearon los parámetros clínicos, realizando el examen objetivo general. Los parámetros fueron determinados dos veces por día (en la mañana y en la tarde) a través del examen clínico de rutina (evaluación de frecuencia cardíaca por auscultación cardíaca, frecuencia respiratoria por visualización de parilla costal, temperatura rectal con termómetro digital y frecuencia ruminal a través de palpación-auscultación con estetoscopio en la fosa del flanco izquierdo). El examen clínico se realizó durante los primeros 15 días del experimento. Luego se continuó con la observación diaria cada vez que se ofrecía el alimento.

Se realizó la extracción de sangre una vez por día, hasta completar los 9 días de la administración del subproducto. La sangre colectada se colocó en tubos sin anticoagulante y el suero fue congelado a -20°C hasta el día del análisis. En estas muestras se determinaron la concentración de enzimas hepáticas (GGT y AST, FAS), urea, creatinina, albúmina, proteínas totales, NEFA, colesterol en el Laboratorio "Dr. Miguel C. Rubino" de la DILAVE, Montevideo.

A los 15 días de iniciar la administración de la *B. carinata* se realizó la ruminocentesis para extracción de líquido ruminal en la región craneal al pliegue de la babilla (Fig. 3).



Figura 3. Ruminocentesis en la región craneal al pliegue de la babilla.

En dichas muestras se determinó el color, olor y pH utilizando tiras reactivas (Fig. 4) y pH-metro digital (Fig. 5). Además se realizó la prueba de reducción de azul de metileno. Se utilizó como referencia lo reportado por Rosenberger (1977) para determinar las características físico-químicas del líquido ruminal.



Figura 4. Tiras Reactivas para medición de pH del líquido ruminal.



Figura 5. Medición del pH del líquido ruminal con peachímetro digital

7.2. Experimento 2

Como se mencionó anteriormente, la *B. carinata* utilizada en este experimento se obtuvo directamente desde la planta procesadora y fue traída a la Estación Experimental, a diferencia de la usada en el experimento 1, que provenía del tambo donde ocurrió el caso espontáneo.

En este trabajo se utilizaron 15 novillos de la categoría de 1 a 2 años de edad, de la raza Holando.

Diez días previos al comienzo del ensayo fueron dosificados con el propósito de desparasitarlos con Panacur 10%® (Fenbendazol) con una dosis de 5 mg/kg. Se dividieron los animales en 3 grupos de 5 animales cada uno, bloqueados por peso vivo. Se los identificó a dos de los grupos con collares de distintos colores, siendo el grupo control negativo que recibió 0 kg/BF de subproducto de *Brassica carinata*, grupo dosis baja con collar verde (Tratamiento 2: 0,2 kg/BF de subproducto de *Brassica carinata*) y grupo dosis alta con collar color rojo (Tratamiento 3: 0,5 kg/BF de *B. carinata*).

Antes de ser asignados a los respectivos tratamientos se realizó un examen clínico general de los novillos, con el objetivo de comprobar su estado de salud. En cada animal se realizó el examen externo, se evaluaron las mucosas, ganglios externos, prueba de la cruz y de la yugular, temperatura rectal,

frecuencia cardíaca, respiratoria y ruminal. Toda la información fue registrada en planillas. Una vez verificados estos datos, se realizó la medición del peso vivo, característica que se utilizó para realizar bloques y posteriormente se asignaron al azar a cada grupo.

Los tratamientos se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Tratamientos realizados: identificación de terneros, peso vivo, dosis de *Brassica carinata* en base fresca, administrada por animal. Tratamiento 1: 0 kg/BF, Tratamiento 2: 0,2 kg/BF, Tratamiento 3: 0,5 kg/BF de *B. carinata*.

Ternero	Peso vivo	Bloque	Tratamiento	Dosis de subproducto de <i>Brassica carinata</i> (KgBF/animal)
1393	145,5	2	1	0
1392	202	5	1	0
1396	173	3	1	0
2815	144	1	1	0
3734	174,5	4	1	0
1397	199	5	2	0,2
2816	165	3	2	0,2
2819	147	2	2	0,2
2820	114	1	2	0,2
3753	187,5	4	2	0,2
2818	165,5	3	3	0,5
2821	147,5	2	3	0,5
2822	141,5	1	3	0,5
3732	201	5	3	0,5
3747	190	4	3	0,5

Una vez asignados a los tratamientos se colocó a cada grupo, en parcelas de campo natural mejorado en base a diferentes mezclas de leguminosas y gramíneas. Los animales de cada grupo pastorearon juntos en una misma parcela. El tratamiento de dosis alta estuvo en una parcela con Raigrás (*Lolium multiflorum*) y Trébol rojo (*Trifolium pratense*), mientras que el tratamiento de la dosis baja fue de *Dactylis glomerata* y Alfalfa (*Medicago sativa*). La parcela del grupo control era de Festuca (*Festuca arundinacea*), Trébol blanco (*Trifolium repens*) y Lotus (*Lotus corniculatus*).

A todos los grupos se les colocó un comedero dentro de la parcela y durante una semana se le ofreció 1 kilo de afrechillo de trigo para su adaptación.

Luego de ese periodo se le ofreció mezclado con el afrechillo la torta de *B. carinata* a los tratamientos 2 y 3 (Fig. 6). El otro grupo, fue el control negativo y solo recibió el afrechillo de trigo.



Figura 6. Suplementación colectiva de Afrechillo de trigo (Asignación 1kgBF/animal).

7.3. Análisis químico de la torta de *B. carinata*

Se analizó la composición química del subproducto, evaluando la materia seca por el método AOAC 925.10:2012 - Incertidumbre 0.1%, fibra detergente neutra por ANKOM Technology Method, proteína cruda por el método AOAC 920.87:2012 E 15/90 - Incertidumbre 0.5%, fibra cruda por el método AOAC 978.10:2012 E 15/90 - Incertidumbre 1%, aceites y grasas por el método AOCS Ba 3-38:2009 Incertidumbre 0.5% y cenizas por el método AOCS Ba 5a-49:2009 - Incertidumbre 0.2%. Estos análisis fueron realizados en el Laboratorio Analítico Agroindustrial de Paysandú.

Para determinar si existía alguna diferencia en la composición de los compuestos liposolubles entre los subproductos de *B. carinata* utilizados en ambos experimentos (Muestra 1: experimento 1, Muestra 2: experimento 2), se realizaron análisis por parte del equipo del Polo Agroalimentario Agroindustrial del CENUR Litoral Norte, del Departamento de Química, dirigido por el Ing.

Quim. Guillermo Moyna. Se utilizó la técnica de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (H-RMN), utilizando un espectrómetro de Resonancia Nuclear Magnética de 600 MHz. Esta técnica es utilizada principalmente en la elucidación de estructuras moleculares en base a la estructura de los átomos de hidrogeno y de carbonos.

7.4. Procesamiento histopatológico.

Se les realizó la necropsia de los animales que murieron en este experimento, se evaluó pH del líquido ruminal, urinario y se extrajo material para hacer estudios histopatológicos. Para esto se colocaron trozos de todos los órganos en formol bufferado al 10% y se remitieron al Laboratorio Regional Noroeste de la DILAVE.

8. RESULTADOS

8.1. Reproducción experimental

8.1.1. Experimento 1

La administración de subproducto de *B. carinata* en este experimento no causó la muerte de los animales. No se observaron signos clínicos que indicaran toxicidad de este subproducto en ninguno de estos.

En la tabla 3 se presenta la composición química del expeller de la *B. carinata* utilizada en éste experimento.

Tabla 3. Composición química de la *B. carinata* que se utilizó el Experimento 1.

Parámetros	Unidad	Resultados
Materia seca	(%)	89,4
Fibra detergente acida	(%)	14
Fibra detergente neutra	(%)	26,5
Proteína	(%)	29,8
Fibra cruda	(%)	7,85
Aceites y grasas	(%)	24,5
Cenizas	(%)	7,1

8.1.1.1. Parámetros clínicos

Los parámetros clínicos temperatura, frecuencia cardíaca, frecuencia ruminal y frecuencia respiratoria fueron evaluados durante el experimento y son presentados en las figuras 7, 8, 9 y 10. Estos se mantuvieron dentro de los valores de referencia en la mayor parte del experimento.

En la Figura 7 se presentan los resultados de la temperatura rectal de los terneros del experimento 1. La temperatura rectal estuvo dentro del rango establecido para terneros (Valor de referencia 38,5 – 39,5°C para terneros, Radostits y col, 2002).

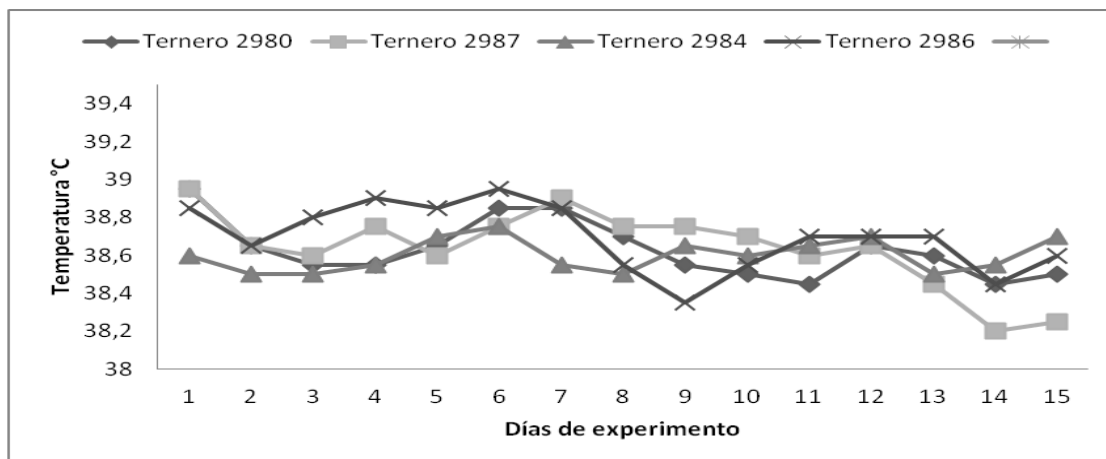


Figura 7. Temperatura rectal de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 control negativo, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 8 se presentan los resultados de la frecuencia cardíaca de los terneros del experimento 1. Hasta el día 3 del experimento, se detectaron los valores más altos, luego permaneció sin mayores variaciones dentro de lo normal (Valor de referencia FC 80-120 lat/min para terneros, Radostits y col, 2002).

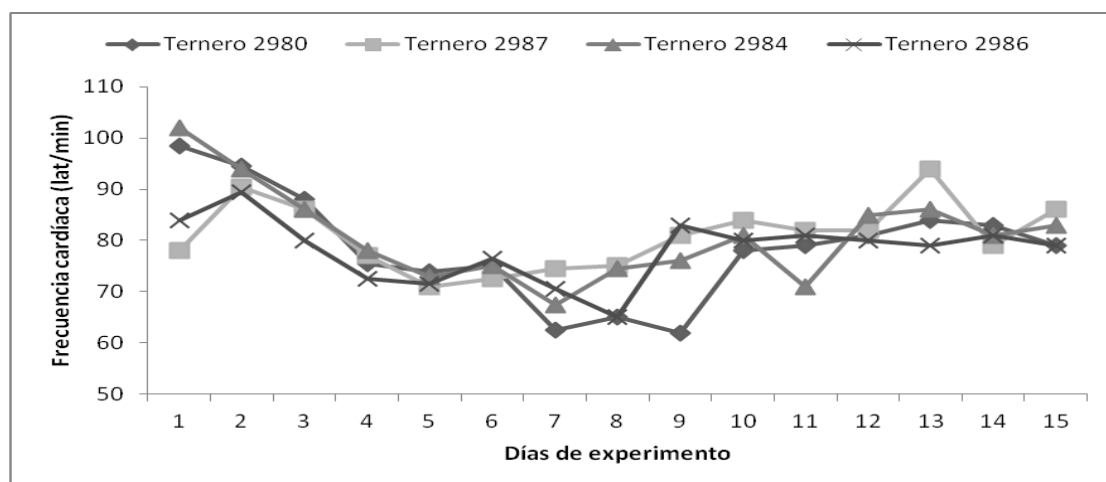


Figura 8. Frecuencia cardíaca de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 9 se presentan los resultados de la frecuencia ruminal de los terneros del experimento 1. La frecuencia ruminal estuvo dentro del rango establecido para terneros (Valor de referencia 5 – 8 contracciones/5 min para terneros, Radostits y col, 2002).

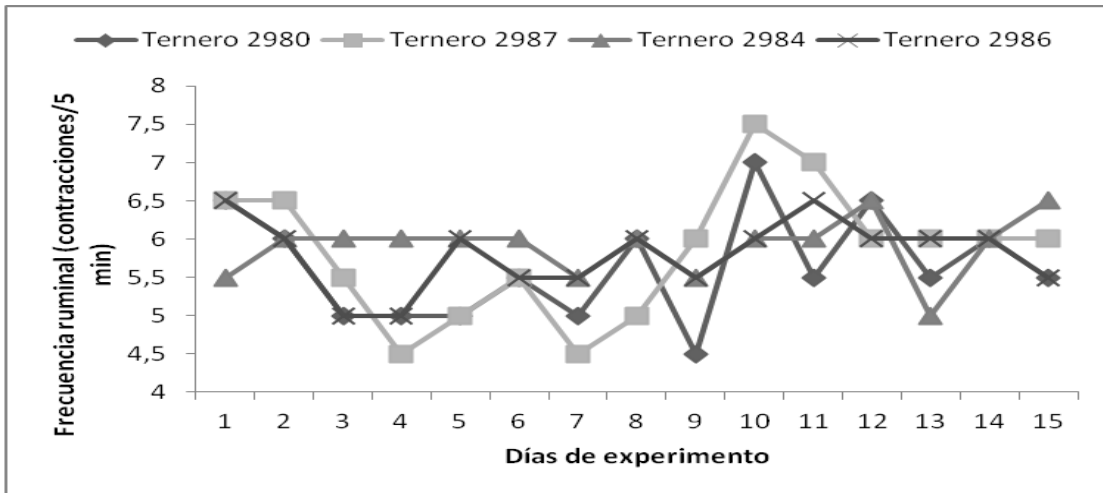


Figura 9. Frecuencia ruminal de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 10 se presentan los resultados de la frecuencia respiratoria de los terneros del experimento 1. Se observaron valores por encima de lo aceptado al inicio del experimento, luego permanecieron dentro de lo normal (Valor de referencia FR 24-36 rpm para terneros, Radostits y col, 2002).

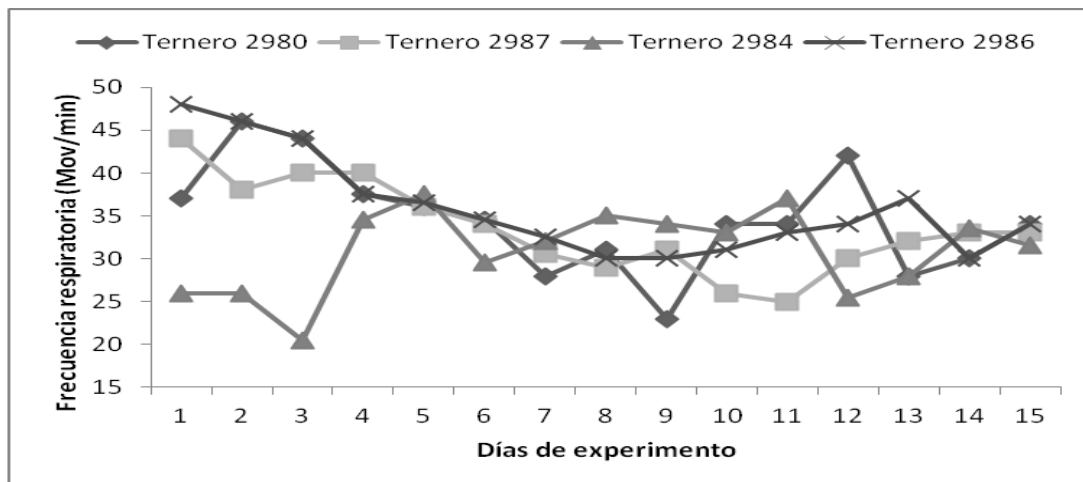


Figura 10. Frecuencia respiratoria de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

8.1.1.2. Parámetros sanguíneos

Los resultados de los estudios de niveles séricos de albúminas, proteínas totales, urea, ácidos grasos no esterificados (NEFA), colesterol, creatinina, enzimas gamma glutamil transferasa (GGT), aspartato aminotransferasa (AST), y fosfatasa alcalina (FAS), son presentados en las figuras 11 a 19.

En la Figura 11 se presentan los resultados de los valores séricos de albúmina en los terneros del experimento 1. Los valores mostraron variaciones a lo largo del experimento, alternando días por encima del límite normal y otros por debajo (Valor de referencia 30 – 37 g/L para ganado vacuno, DILAVE Dr. Miguel C. Rubino).

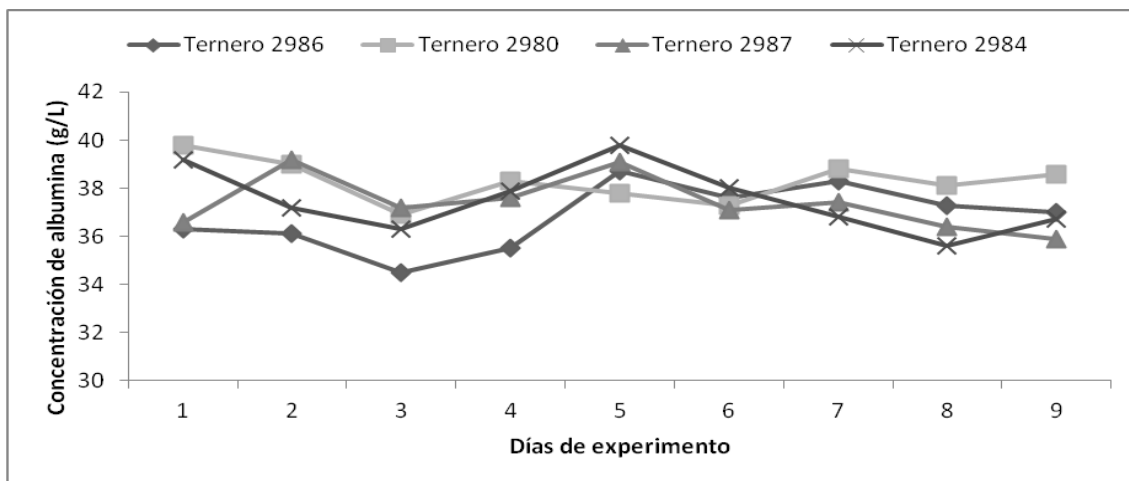


Figura 11. Concentración de albúmina de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 12 se presentan los resultados de los valores séricos de proteínas totales en los terneros del experimento 1. Los valores estuvieron dentro del rango normal (Valor de referencia 66 – 90 g/L para ganado vacuno, DILAVE Dr. Miguel. C. Rubino).

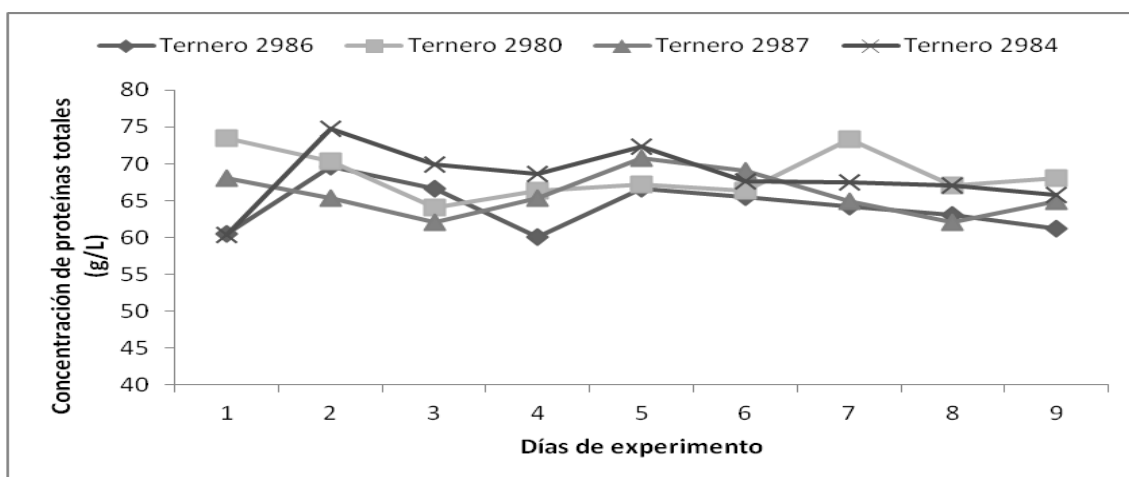


Figura 12. Concentración de proteínas totales de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día,

2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 13 se presentan los resultados de los valores séricos de urea en los terneros del experimento 1. Los valores estuvieron dentro del rango normal. (Valor de referencia 2.0 – 5.93 mmol/L para ganado vacuno, DILAVE Dr. Miguel C. Rubino)

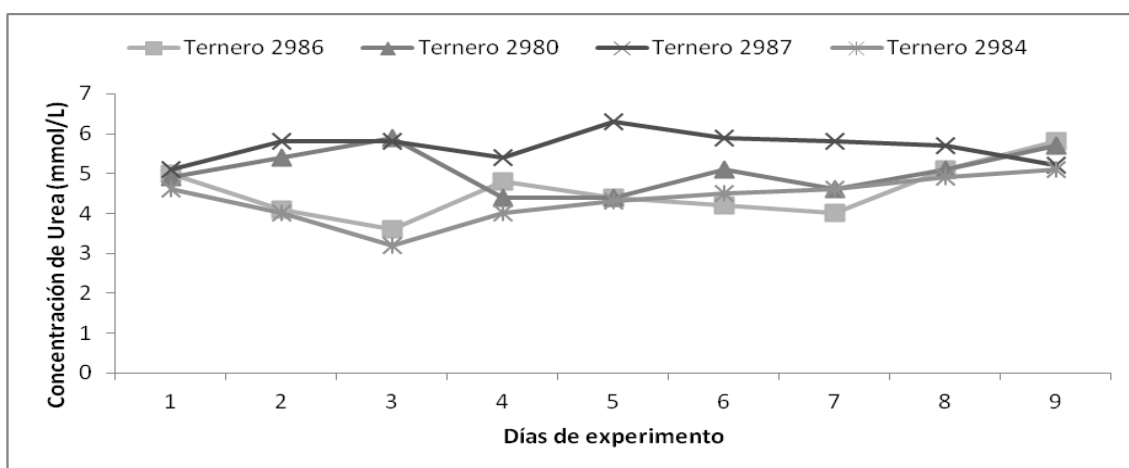


Figura 13. Concentración de urea de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 14 se presentan los resultados de los valores séricos de NEFA en los terneros del experimento 1. Se observan valores elevados en el primer día, lo que indica movilización de grasa, esto coincide con el momento de menor consumo de alimento por parte de los animales, debido al rechazo.

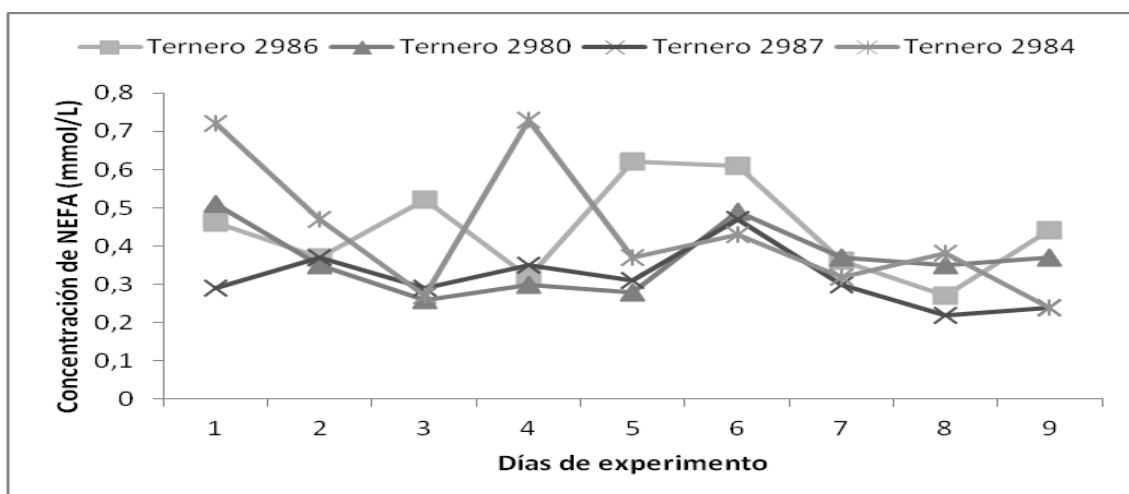


Figura 14. Concentración de NEFA de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

El valor de referencia para los NEFA es $\leq 0,4$ mmol/L para ganado vacuno (DILAVE Dr. Miguel C, Rubino).

En la Figura 15 se presentan los resultados de los valores séricos de colesterol en los terneros del experimento 1. Los valores estuvieron dentro del rango normal. (Valor de referencia 1 – 5,6 mmol/L para ganado vacuno, Radostitis y col, 2002).

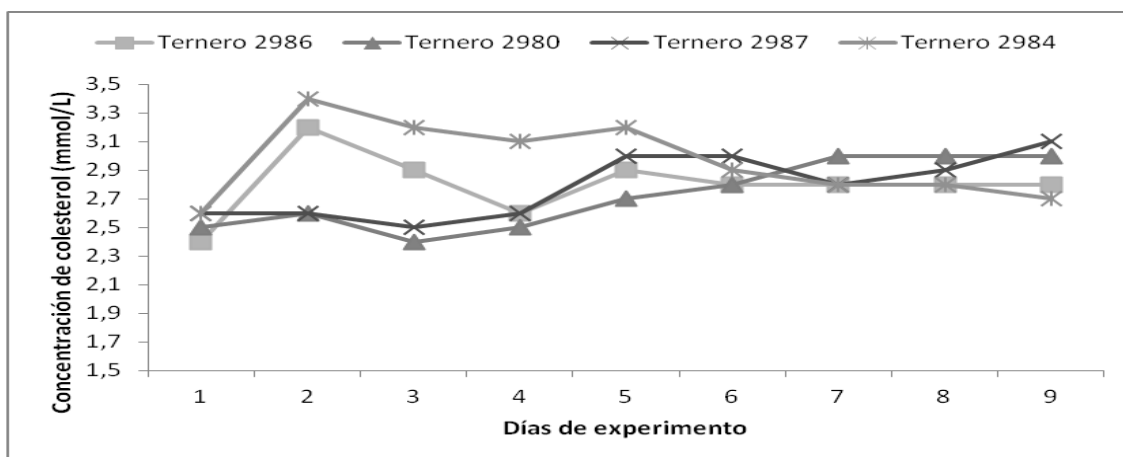


Figura 15. Concentración de colesterol de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 16 se presentan los resultados de los valores séricos de creatinina en los terneros del experimento 1. (Valor de referencia 0,8 - 1,4 mg/dl para ganado vacuno (<http://proclave.com/servet/valoresref.htm>)).

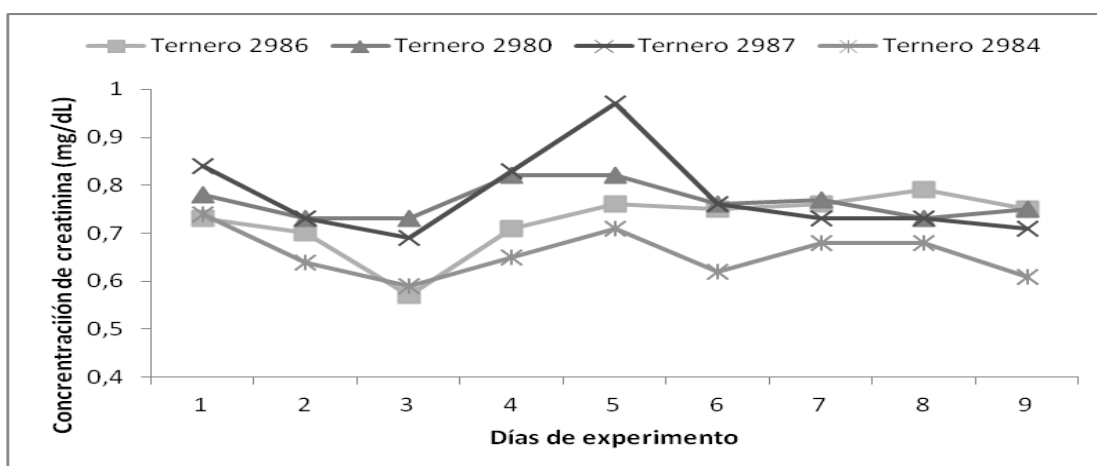


Figura 16. Concentración de creatinina de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 17 se presentan los resultados de los valores séricos de GGT en los terneros del experimento 1. Los valores estuvieron por encima del límite normal aceptado en todos los animales del experimento (Valor de referencia <20 Unidades/L para ganado vacuno, DILAVE Dr. Miguel C, Rubino).

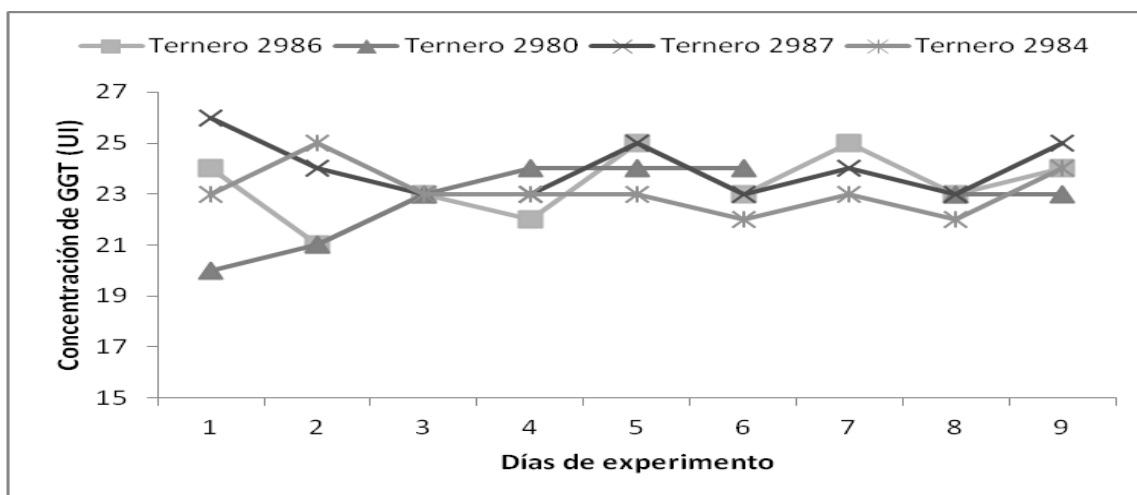


Figura 17. Concentración de GGT de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 18 se presentan los resultados de los valores séricos de AST en los terneros del experimento 1. Los valores estuvieron dentro del rango normal (Valor de referencia <90 Unidades/L para ganado vacuno, DILAVE Dr. Miguel C. Rubino), excepto para el ternero 2984 el día 4 del experimento y día 6 para el ternero 2987.

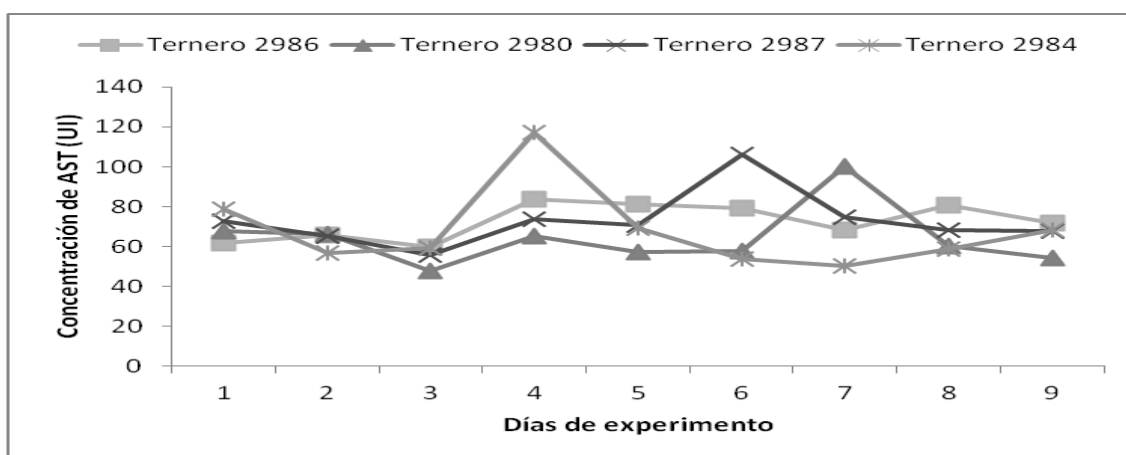


Figura 18. Concentración de AST de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

En la Figura 19 se presentan los resultados de los valores séricos de FAS en los terneros del experimento 1. Los valores estuvieron por encima del límite

normal aceptado en todos los animales del experimento (Valor de referencia <240 Unidades/L para ganado vacuno, DILAVE Dr. Miguel C. Rubino).

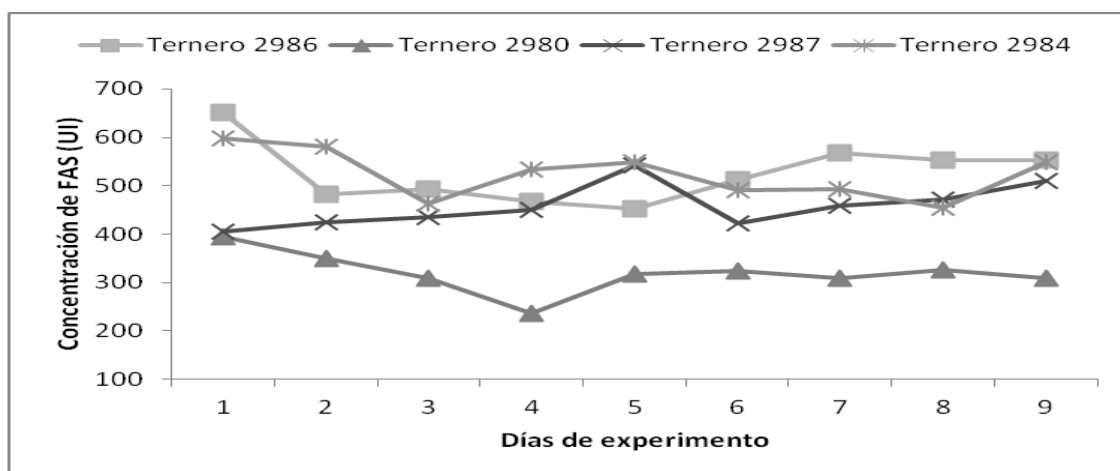


Figura 19. Concentración de FAS de los terneros del experimento 1 durante el periodo estudiado. Terneros: 2986 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22 kg/día de *B. carinata*. Los kilos se expresan en base fresca.

8.1.1.3. Evaluación del líquido ruminal

En la tabla 4 se presentan los resultados de la evaluación del líquido ruminal en los terneros del experimento 1.

Tabla 4. Resultados de los estudios realizados en el líquido ruminal. Ternero 2986: 0kg/día, 2984: 0,186 kg/día, 2980: 0,19 kg/día y 2987: 0,22kg día. Los kilos se expresan en base fresca.

Tratamiento	Pruebas realizadas			
	Color	Olor	pH	Reducción de azul de metileno
C. Negativo	Verde oliva	Sui generis	6,75	<10 min. Actividad reductora
0,186kg/día	Verde claro	Sui generis	6,81	<10 min. Actividad reductora
0,190kg/día	Verde oscuro	Sui generis	6,40	<10 min. Actividad reductora
0.220kg/día	verde oliva	Sui generis	7,10	<10 min. Actividad reductora

8.1.2. Experimento 2

El examen clínico realizado previamente, antes de asignar los animales a los tratamientos, determinó que los animales estaban sanos y aptos para ingresar al experimento.

Como resultado de la administración del subproducto de la *B. carinata* en éste experimento murieron 3 animales. Dos de los terneros correspondían al tratamiento con alta dosis de subproducto (0,5 kg por animal, terneros 2822 y 3732) y uno al grupo de baja dosis (0,2 kg por animal, ternero 2820). Los demás terneros no manifestaron ningún signo clínico y fue inmediatamente suspendida la administración de la *B. carinata*.

Tabla 5. Composición química de la *B. carinata* que se utilizó en el experimento 2.

Parámetros	Unidad	Resultados
Materia seca	(%)	91,2
Fibra detergente acida	(%)	6
Fibra detergente neutra	(%)	11
Proteína	(%)	27,4
Fibra cruda	(%)	2,2
Aceites y grasas	(%)	35,8
Cenizas	(%)	5,5

En la Figura 20 se observan diferencias en los espectros de ^1H -RMN entre las muestra 1 y muestra 2. La *B. carinata* de la muestra 1 corresponde a la utilizada en el experimento 1 y la muestra 2 a la utilizada en el experimento 2. En dicho análisis se llegó a determinar la presencia de una sustancia liposoluble, que estaba presente en ambas muestras (M1 y M2), pero que en la muestra 2 estaba en mayor proporción. Con este tipo de análisis no es posible saber específicamente a que sustancia corresponde, pero de acuerdo a lo informado por el Ing. Quim. Guillermo Moyna no corresponde con el espectro del ácido erúxico.

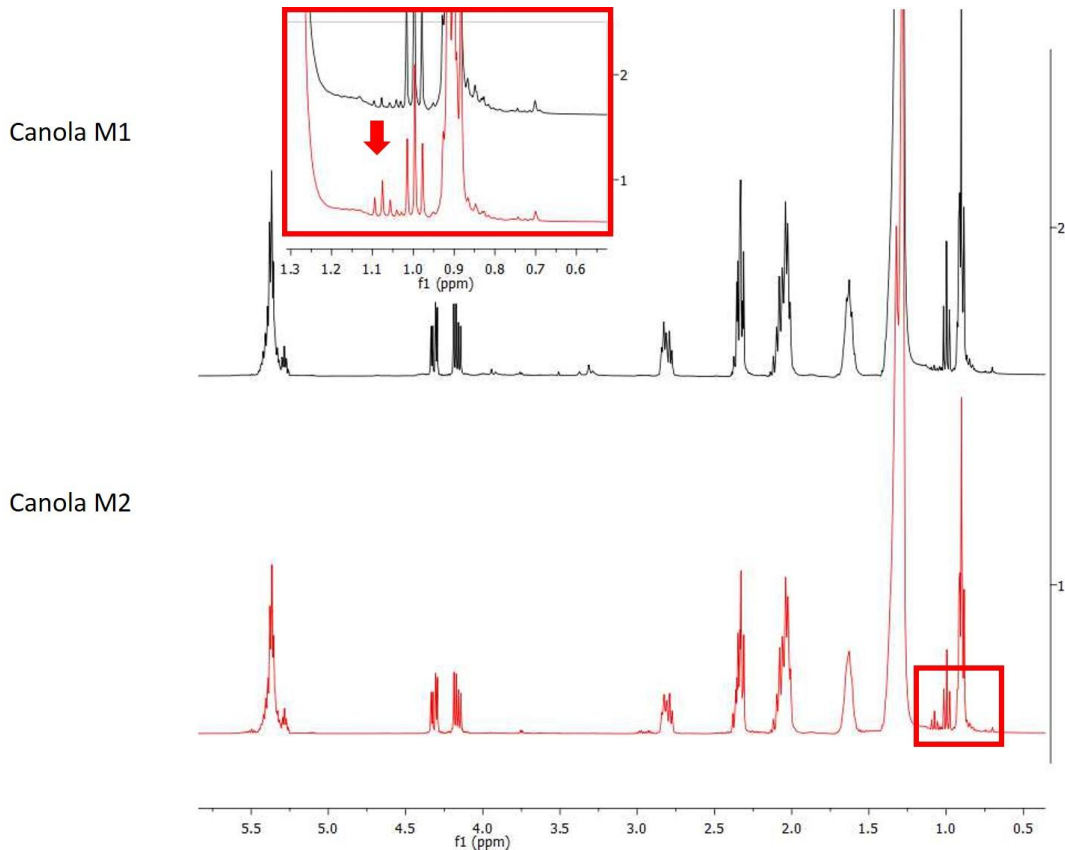


Figura 20. Espectro de H-RMN de las muestras 1 (M1) y 2 (M2) de la torta de *B. carinata*. En el cuadro inserto, se muestra el espectro de una sustancia que estaba en mayor proporción en la muestra 2, correspondiente a la utilizada en el experimento 2.

La administración de la mezcla de afrechillo de trigo y el subproducto de la *B. carinata* se realizó el día 18/9/2015 entre las 17:00 y 18:00 hs. A la mañana del día siguiente de la administración, el día 19/9/2015, se encontraron los animales muertos, asumiendo que murieron rápidamente luego del consumo de la mezcla por el estado de rigidez de los animales. Al momento de la necropsia tenían por lo menos unas 7 a 8 hs de muertos. Los resultados del pH del líquido ruminal estaban dentro de lo normal (valor de referencia para bovino 6,2 a 7,2, Radostits y col., 2002). Los demás animales que sobrevivieron no manifestaron ningún signo clínico, siendo suspendida la administración del subproducto, inmediatamente.

8.1.2.1. Lesiones macroscópicas

Las lesiones macroscópicas que se destacaba en los tres animales eran similares con distintos grados afectación. Las lesiones principales estaban restringidas al tracto digestivo, principalmente al rumen y retículo.

En estos órganos se destacaba el desprendimiento de la mucosa y el enrojecimiento de la submucosa en toda su extensión (Fig. 21 y 22).



Figura 21. Rumen del ternero 3732. Enrojecimiento de la submucosa y desprendimiento de la mucosa.

También la mucosa del intestino delgado se presentaba hemorrágica y edematosa, junto con ganglios mesentéricos aumentados de tamaño (Fig. 23).



Figura 22. Rumen del ternero 2820. Enrojecimiento de la submucosa y el desprendimiento de la mucosa.

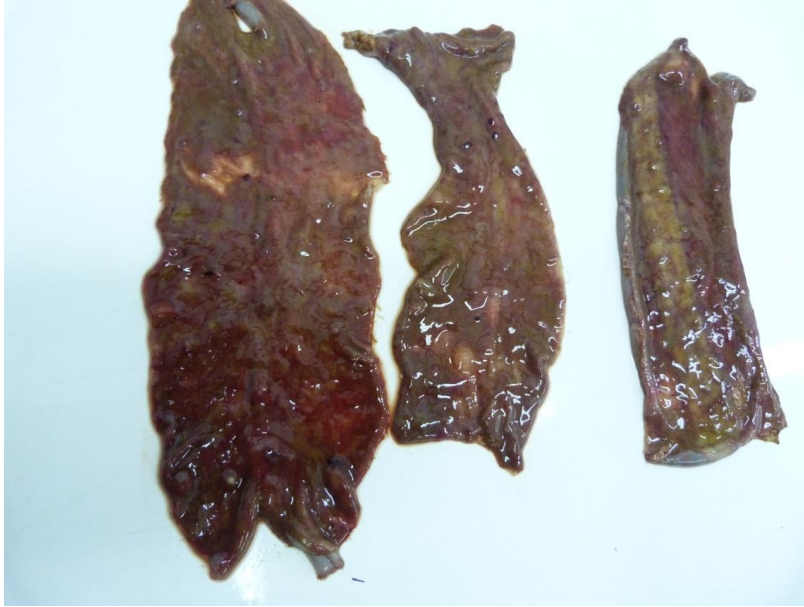


Figura 23. Intestino delgado ternero 3732. Enrojecimiento de la mucosa intestinal.

El hígado presentaba una leve hepatomegalia en los tres terneros con aumento de tamaño de la vesícula biliar (Fig. 24).



Figura 24. Hígado. Leve aumento del tamaño del hígado reflejado en los bordes que se presentan aumentados de espesor. La vesícula biliar también se muestra aumentada de tamaño.

Los riñones se presentaban congestivos en la superficie de corte tanto en médula como en la corteza en los animales 2820 y 3732, mientras que en el animal 2822 estaban pálidos (Fig. 25 y 26).

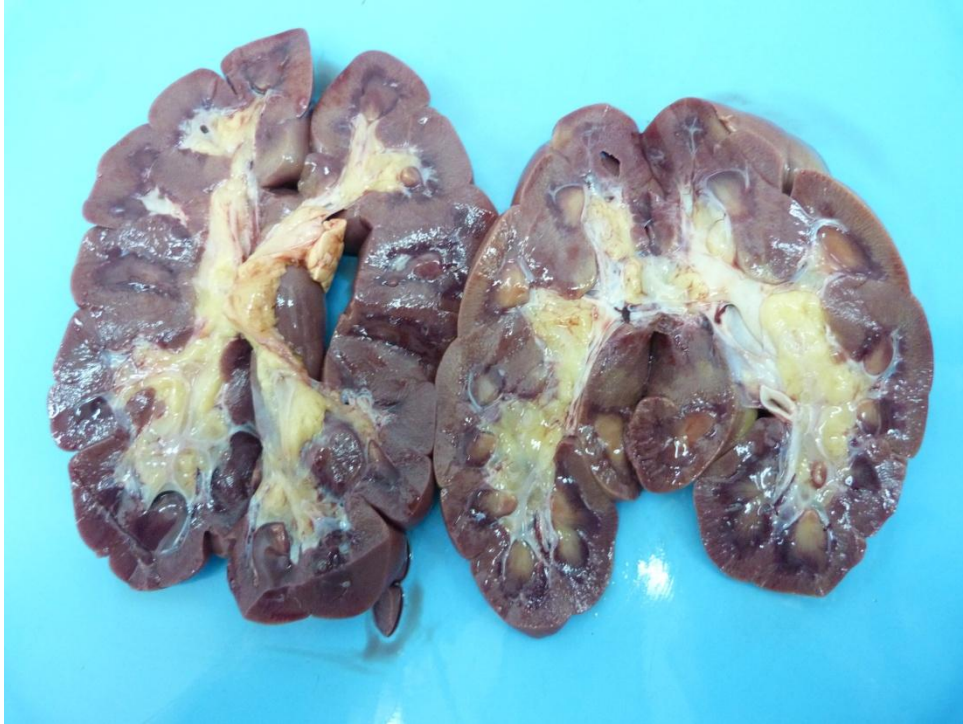


Figura 25. Riñones del ternero 3732. Corteza pálida



Figura 246. Riñones del ternero 2822. Palidez de los riñones.

En el ternero 2820 se evidenciaba el corazón con áreas más claras en el miocardio (Fig. 27).

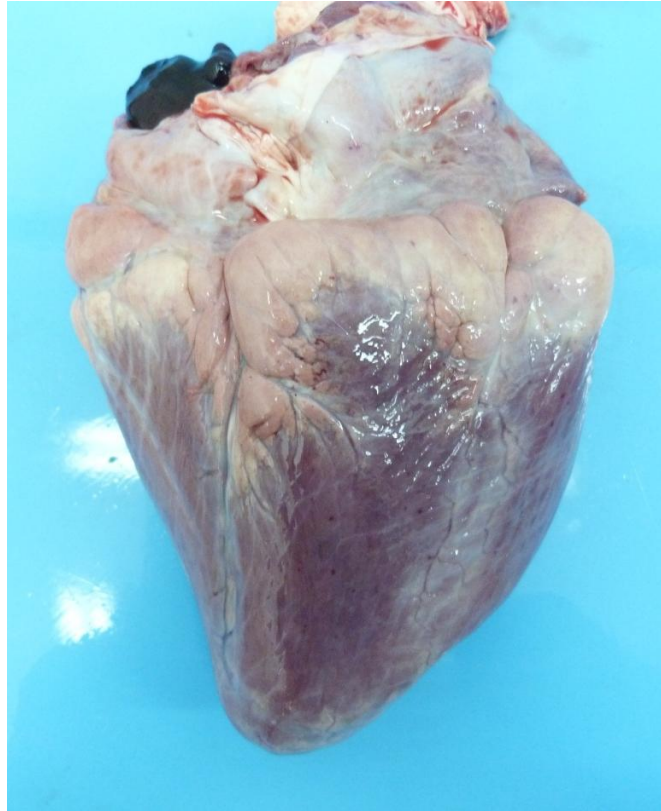


Figura 27. Ternero 2820. Corazón con áreas del miocardio en zona ventricular de coloración más pálida.

8.1.2.2. Lesiones microscópicas

Las lesiones que se destacaban en todos los terneros eran similares con diferentes grados de afectación y estaban restringidas principalmente en: rumen que presentaba una degeneración balonosa del epitelio ruminal con áreas de desprendimiento de la mucosa, con necrosis. También había enteritis linfocitos eosinofílica difusa severa. En el sistema nervioso central se destacaba el edema “vasogénico” (lesión vascular con ruptura de la barrera hematoencefálica) y algunas hemorragias perivasculares a nivel de la corteza cerebral. Los animales 2820 y 2822 presentaban lesiones a nivel renal, se observaron glomérulos reducidos de tamaño y con contenido eosinofílico y túbulos con severa degeneración de las células epiteliales. En el ternero 2822 también se observaron focos de gliosis en el tronco encefálico, y además el hígado presentaba disociación de hepatocitos, infiltrado linfoplasmocítico multifocal a predominio periportal (hepatitis severa) y congestión de los sinusoides hepáticos a igual que en el ternero 2820. En ese mismo animal se destacaba una lesión a nivel del músculo cardíaco, con áreas multifocales de degeneración y necrosis de células musculares, asociado con áreas de hemorragia.

9. DISCUSIÓN

En el primer experimento realizado no se logró reproducir la intoxicación y no se encontraron resultados que hicieran sospechar de algún efecto de este subproducto, sin embargo en el experimento dos, se comprobó que la torta de *B. carinata* fue tóxica para los bovinos. En el segundo experimento, la suplementación con la torta de *B. carinata* utilizada en la misma proporción que la reportada en el brote espontáneo, provocó la muerte de tres de los 10 animales que consumieron la *B. carinata*.

Si bien en los dos experimentos se utilizó la torta de *B. carinata*, los dos subproductos eran diferentes, no teniendo las mismas características físicas y químicas. El subproducto utilizado en el Experimento 2 tenía características macroscópicas (color y consistencia más aceitosa) y su composición química era diferente al utilizado en el primer experimento. Presentaba menor porcentaje de fibra detergente ácida y neutra, menor cantidad de fibra cruda y mayor proporción de aceites y grasas (diferencia de 11,3%). Tanto la fibra detergente ácida como la neutra, indican que el subproducto usado en el experimento 1 contenía mayor cantidad de componentes fibrosos tales como celulosa, hemicelulosa, lignina y sílice, siendo llamado en su conjunto “fracción de pared celular” (Pigurina & Methol, 2004). Las dos tortas de *B. carinata* utilizada contenían porcentajes altos de proteína cruda (29,8 y 27,4%, respectivamente) lo que determina que, este tipo de subproductos derivados de la Canola, se utilicen en la alimentación de rumiantes con el objetivo de remplazar otras fuentes de proteínas como por ejemplo las derivadas de la soja. Otro aspecto relevante de este producto es la cantidad de aceites y grasas (24,5 y 35,8% para la torta del Exp. 1 y 2 respectivamente). Además de la cantidad de grasas, es interesante conocer como es la composición de esas grasas, respecto al perfil de los ácidos grasos. En la bibliografía se reporta que la Colza tiene un 90 % de ácidos grasos insaturados, siendo un 57 % oleico (C18:1), 20,5 % linoleico (C18:2), linolenico (C18:3) 9%, C \geq 20 4,4%, palmítico (C16:0) 5%, palmitoleico (C16:1) 0,3%, esteárico (C18:0) 2,2% y el resto (FENDA 2016).

El contenido de grasas es una limitante en la alimentación de los rumiantes por los efectos que producen en el funcionamiento ruminal. Referido al metabolismo ruminal de las grasas, el rumen cumple funciones tales como 1) absorber directamente los ácidos grasos de 14 átomos de C o más cortos, 2) hidrolizar los triglicéridos y, 3) hidrogenar y saturar los ácidos grasos liberados. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (> 20 C) son más tóxicos para los microorganismos ruminales que los ácidos grasos de cadena intermedia. Por otro lado, los ácidos grasos de cadena corta (< 14 C) y los de cadena muy larga (> 20 C) tienen una digestibilidad más reducida (FENDA 2016). Además lo que se ha estudiado es la relación entre la cantidad de ácidos grasos insaturados/saturados en las grasas y su valor nutricional para los bovinos. En estudios in vitro (Henderson, 1973; Maczulak y col., 1981, citados por Plascencia y col, 2005) han demostrado que los ácidos grasos insaturados juegan un papel más activo en la inhibición de las bacterias ruminales, particularmente las celulolíticas y de los ácidos grasos insaturados evaluados,

el oleico (C18:1) fue el mayor inhibidor. También se ha determinado el nivel de inclusión en las dietas que depende del valor energético, siendo considerando niveles de inclusión en la dieta inferiores al 3-4% para las grasas saturadas y al 1-2% para las poliinsaturadas (FENDA 2016).

En este trabajo se intentaron detectar las diferencias en la composición química que explicaran los efectos producidos por el consumo de la torta. En el estudio realizado se determinó la presencia de una sustancia liposoluble presente en mayor proporción en el subproducto utilizado en el segundo experimento. Si bien no se logró establecer cuál era esa sustancia, porque implicaba la utilización de técnicas más complejas, se pudo determinar que el componente no era compatible con el ácido erúxico (Comunicación personal, Ing. Quim. Guillermo Moyna); generalmente reportado como uno de los ácidos grasos tóxicos de este tipo de subproductos (Falasca y Uberich, 2010).

Las Brassicas en general, presentan un alto contenido de ácido erúxico y glucosinolatos en sus semillas, por lo que tiene uso limitado en la alimentación animal (Bozzini y col, 2007). Respecto a la *B. carinata*, no se encontraron trabajos donde se reportara el uso de esta planta o subproducto en la alimentación animal. Sin embargo, debido a que la misma es una alternativa importante para la producción de biodiesel a nivel mundial y de Uruguay, se ha empezado a utilizar en la alimentación animal. Específicamente se encontró bibliografía referido a la degradación ruminal de este alimento en condiciones *in vitro*, siendo los resultados alentadores (Hangshu & Peiqiang, 2014), pero no se ha estudiado a nivel *in vivo* para establecer los posibles efectos tóxicos reportados en otras especies de *Brassicas*.

En relación al consumo de los distintos subproductos utilizados, se podría decir que en el experimento 1, hubo cierto rechazo por parte de los terneros, notándose algo de dificultad a la hora del consumo voluntario. Esto puede estar explicado por la diferencia en la composición química, la cual podría afectar la palatabilidad del subproducto. El sabor de una comida es relacionado con el efecto provocado en el organismo y en base a esa relación sabor-consecuencia, los animales usan una segunda relación sabor-olor (o sabor-visión) para seleccionar dietas apropiadas (Provenza y Villalba, 2006). La preferencia por una comida disminuye si dicha comida contiene toxinas, o si es consumida en forma frecuente o excesiva. Los excesos de nutrientes (Ej nitrógeno) provocarían estados transitorios de rechazo y, consecuentemente, la saciedad podría explicarse como el desarrollo de un estado aversivo que inhibe el consumo (Provenza, 1996). En particular con la Canola está reportado que la alta concentración de glucosinolatos generan rechazo del alimento (Martinio y col, 1999), no siendo posible en este trabajo determinar la concentración de este producto. Referido a los glucosinolatos existe también una gran variabilidad en la concentración de dichos compuestos dentro de una misma especie, así como entre las distintas partes de la planta (raíces, tallo, hojas y semillas), o en función del estado fenológico y de los nutrientes disponibles (Bellotas y col, 2007), lo que puede también determinar la variación en la toxicidad de las dos tortas utilizadas.

Otro factor que puede haber afectado el consumo, además de la composición química, puede ser la forma de suministrar el alimento, que fue en forma individual, mientras que en el experimento 2 en forma colectiva. Es conocido que cuando un alimento se suministra de forma colectiva existe el fenómeno de facilitación social, definido como un incremento de actividad resultante de la presencia de otro individuo, lo que permite los animales “aprendan” observando a los demás. Cuando los animales comen en grupo comen más que si fuesen alimentados separadamente (Petryna y Bavera, 2002). Otra causa que podría haber afectado el consumo voluntario fue que el subproducto en el experimento 1 se administró junto con una ración pelleteada para terneros, dificultando el correcto mezclado de los alimentos.

Los parámetros clínicos no presentaron grandes variaciones a lo largo del experimento 1, si bien para la frecuencia cardíaca y frecuencia respiratoria los valores fueron altos al inicio del experimento, causa que se le podría atribuir al estrés generado producto del manejo de los terneros y el corto periodo de acostumbramiento que tuvieron. Los valores de frecuencia ruminal estuvieron dentro de lo normal. La motilidad ruminal varía de acuerdo a la alimentación, los movimientos del saco dorsal oscilan entre un mínimo normal de 5 contracciones a un máximo normal de 8 contracciones en 5 minutos. El color depende del alimento, será verde, verde oliva, o verde marronáceo, el olor del contenido del rumen normalmente es aromático y aunque es penetrante, no resulta inaceptable para el olfato. El pH varía según la alimentación, no obstante los límites normales serían entre 6,2-7,2 (Radostits y col, 2002). Esto demuestra junto a los resultados de la evaluación del líquido ruminal que el subproducto no afectó ni la función motora ni la bioquímica del órgano y que los animales con el correr de los días se fueron adaptando a la dieta que se le fue suministrando.

Con respecto a los parámetros bioquímicos de los bovinos del experimento 1, los valores séricos de albúmina, proteínas totales, urea y colesterol, estuvieron dentro de lo indicado para terneros, no así para los valores de NEFA que mostraron oscilaciones principalmente en el ternero control negativo. La movilización lipídica incrementa la concentración plasmática de los ácidos grasos no esterificados (NEFA) (Luna y col, 2013). Las determinaciones de urea y creatinina en sangre son componentes esenciales de una evaluación del sistema urinario, las concentraciones de estas no aumentan de forma apreciable por encima del límite normal hasta que se destruye el 60-75% de las nefronas (Radostits y col, 2002). La creatinina aumenta en las glomerulopatías y disminuye en casos de pérdida de masa muscular, adelgazamiento y en hembras gestantes (Radostits y col, 2002). Por lo tanto, los bajos niveles de creatinina de los terneros del experimento 1, junto con la movilización lipídica, podrían indicar un balance energético negativo. Si el gasto de energía es mayor que el consumo, el balance energético es negativo, por lo cual los animales pierden condición corporal (Luna y col, 2013).

Los niveles séricos de GGT y FAS se mostraron levemente elevados durante el experimento, pero esto también ocurrió en el animal control negativo. La actividad sérica de GGT se utiliza como criterio diagnóstico de enfermedades

hepatobiliar (Radostits y col, 2002). Los incrementos en la concentración de GGT están asociados a colestasis o hiperplasia biliar (Stockham & Scott, 2008). Por lo tanto, la alta concentración podría indicar daño hepático, principalmente a nivel canalicular. Los niveles de fosfatasa alcalina en los vacunos tienen márgenes amplios de variación, lo que resulta difícil su interpretación. Para analizar casos de obstrucción biliar resulta útil su detección en suero, sin embargo, se produce una respuesta similar a la lesión en otros tejidos (Radostits y col, 2002).

En el segundo experimento, no se observaron signos clínicos en los animales porque las muertes ocurrieron durante la noche y se encontraron los animales muertos. Las lesiones macro y microscópicas estaban restringidas a nivel de tracto digestivo, renal, hepático y cardiaco. El resto de la población de terneros no presentó ninguna sintomatología.

Se puede afirmar que, por el tipo de lesiones encontradas en la necropsia la misma tuvo una acción directa en el tracto digestivo (Tokarnia y col, 2000). El daño directo sobre la mucosa digestiva, observándose enrojecimiento de submucosa y desprendimiento de la mucosa del rumen. Estudios realizados con glucosinolatos, presentes en las *Brassicas*, demuestran que producen irritación y necrosis local de la mucosa gastrointestinal (ELIKA, 2013). Fueron lesiones agudas, similares a las que se producen por agentes cáusticos en una ruminitis. Las lesiones hepáticas (hepatitis) encontradas en los bovinos muertos, pueden ser consideradas probablemente secundarias a las lesiones gastrointestinales. El hígado está expuesto a infecciones y otras sustancias causantes de lesiones a través de tres principales vías: hematógena, biliar y penetración directa, dado que este órgano recibe el flujo total de la vena porta y como consecuencia es inundado por microbios potencialmente nocivos, que habitan y penetran el sistema digestivo, o por sustancias tóxicas que hayan sido ingeridas o producidas por la microbiota intestinal (Cullen, 2009). La hepatitis reactiva no específica es un proceso difuso distribuido por todo el hígado en respuesta a algunas patologías sistémicas más frecuentemente del tracto gastrointestinal, típicamente hay un infiltrado inflamatorio discreto en el tracto portal y posiblemente en parénquima, sin evidencia de necrosis (Cullen, 2009), esto explica la hepatitis severa encontrada en los bovinos muertos.

A nivel renal hubo un cuadro renal severo, nefrosis. Esto implica que hay algún componente nefrotóxico que puede causar una lesión directa o secundaria en el riñón. Las nefrotoxinas pueden causar lesiones directamente a la célula epitelial, particularmente en túbulos contorneados proximales, después de la conversión intracelular en metabolito activo o secundaria a una vasoconstricción, isquemia y posterior necrosis (Newman y col, 2009).

En uno de los bovinos se destacó una lesión a nivel de miocardio con áreas de degeneración y necrosis de células musculares. Estas evaluaciones histopatológicas de fragmento de miocardio son sustancialmente limitadas con respecto a diagnósticos específicos y un diagnóstico etiológico raramente puede ser alcanzado a partir de las alteraciones morfológicas. Esta inadecuación ocurre pues el espectro de reacciones patológicas es limitado y

debido a que varios agentes nocivos producen lesiones similares en el corazón (Van Vleet y Ferrans, 2009).

De acuerdo a las lesiones encontradas es posible realizar el diagnóstico diferencial con enfermedades que afectan el tracto digestivo, produciendo lesiones agudas en rumen (ruminitis) y falla renal. Por lo tanto las que se reportan como causantes de este tipo de patología son las siguientes: acidosis ruminal, si bien las lesiones patológicas son similares, se descarta porque los animales no presentaron alteración de pH ruminal al momento de realizar la necropsia, ni tampoco existió un excesivo consumo de carbohidratos fácilmente fermentesibles capaces de producir dicha patología (Radostits y col, 2002). También hay que descartar otras causas de ruminitis, especialmente las producidas por plantas tóxicas: *Bacharis coridifolia* (mio mio), si bien causa lesiones patológicas similares en el rumen (Radostits y col, 2002).no se constató la presencia de la planta en los potreros donde pastoreaban los animales muertos.

10. CONCLUSIONES

- La torta de la *B. carinata* fue la responsable de la muerte de los bovinos del segundo experimento.
- No es posible concluir que la muerte de las vacas en el predio comercial, hayan ocurrido por el consumo del producto en cuestión porque el alimento usado en el primer experimento, proveniente de ese predio, no logró reproducir el mismo cuadro cuando se utilizó en igual proporción en terneros.
- Con éstos resultados no es posible establecer la dosis tóxica de la torta de la *B. carinata*, siendo necesario realizar otros ensayos para establecer tal valor y así poder determinar su uso en la alimentación de bovinos.
- En base a los resultados obtenidos y al análisis de información se concluye que es de fundamental importancia conocer la composición química de los alimentos, y con mayor importancia aún, en el caso de subproductos de los cuales hay escasa información.
- El trabajo coordinado entre distintos actores, productor, médico veterinario particular, laboratorio de diagnóstico y Facultad fue relevante para comprender un problema que surgió desde los sistemas productivos.

11. BIBLIOGRAFIA

1. ALUR. (2016). Disponible en: www.alur.com.uy/productos/alimento_animal.php. Fecha de consulta: 7 de junio de 2016.
2. Alves, D. (2013). Colza-Canola una nueva alternativa de invierno. Instituto Plan Agropecuario. Disponible en: http://www.planagropecuario.org.uy/publicaciones/revista/R90/R90_51.htm. Fecha de consulta: 17 de julio de 2016.
3. Barbosa J.D, Oliveira CMC, Tokarnia C.H, Riet-Correa F. (2003). Comparação da sensibilidade de bovinos e búfalos à intoxicação por *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae). *Pesq Vet Bras*; 23(4): 167-172.
4. Bargo F.; Muller L.D.; Kolver, Delahoy J.E. (2003). Invited Review: production and digestion of supplemented dairy cow on pasture. *J. Dairy Sci* 86:1-42.
5. Bargo F.; Muller L.D.; Varga G.A.; Delahoy J.E, Cassidy T.W. (2002). Ruminant digestion and fermentation of high-producing dairy cows with three different feeding systems combining pasture and total mixed rations. *J. Dairy Sci* 85: 2964:2973.
6. Bauza R. (2012). Suplementos Proteicos. Curso de nutrición animal, Facultad de Agronomía, Montevideo Uruguay. Disponible en: <http://prodanimal.fagro.edu.uy/cursos/NUTRICION/MATERIAL.pdf>. Fecha de consulta 13 de junio de 2016.
7. Bavera G.A., Petryna A. (2002). Etología. Cursos de producción bovina de carne, FAV UNRC. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 17 de junio de 2016.
8. Bell J.M, (1993). Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review, *Can J Anim Sci* 1993; 73: 679-697.
9. Bellostas, N., Sorensen, J. C., Sorensen, H. (2007). Profiling glucosinolates in vegetative and reproductive tissues of four Brassica species of the U-Triangle for their biofumigation potential. *Journal of Science of Food Agriculture* 87: 1586-1594.
10. Bones, A.M, Rossiter, J.T. (1996). The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plant* 97:194-208.
11. Borgen BH, Thangstad O, Ahuja I, Trevor J, Magnar A. (2010). Removing the mustard oil bomb from seeds: transgenic ablation of myrosin cells in oilseed rape (*Brassica napus*) produces MINELESS seeds. *J. Exp. Bot*; 61: 1683-1697. Disponible en <http://jxb.oxfordjournals.org/content/61/6/1683.long>.
12. Bouaid A, Diaz Y, Martinez M, Aracil J. (2005). Pilot plant studies of biodiesel production using *Brassica carinata* as raw material. *Catalysis* 193:196
13. Bozzini A., Calcagno F and Soare T (2007). "SINCRON", A new Brassica carinata cultivar for biodiesel production. *Helia*, 30 (46): 207-214.
14. Cabañas, M., de la Luz, M., Lamothe, A. L., Álvarez, D., Domínguez, Y. (2005). Prácticas de Botánica Morfológica y Sistemática. Disponible en: www.ecured.cu/Brassicaceae. Fecha de consulta: 18 de junio de 2016.

15. Cardone M, Mazzoncini M, Menini S, Rocco V, Senatore A, Seggiani M, Vitolo S. (2003). Brassica carinata as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: agronomic evaluation, fuel production by transesterification and characterization. *Biomass and Bioenergy* 25 (6): 623-636.
16. Cartea A. E., Vilar, M., Francisco, M., de Haro, A. 2009. Calidad del aceite de las brásicas cultivadas en Galicia. *Horticultura Internacional*. 69: 22-25.
17. Castillo, A.R, Onetti, S.G. (2002). Origen y composición química de los subproductos agroindustriales. INTA Proyecto Pampa Húmedo p.p 6-13. Disponible en: http://www.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/subproductos_suplementacion.pdf. Fecha de consulta: 18 de julio de 2016.
18. Chen, S, Andreasson, E. (2001). Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(9), 743-758.
19. Cullen, J.M. (2009). Fígado, sistema biliar e páncreas exócrino. En: McGavin, M.D., Zachary, J.F. *Bases da patología em veterinaria*. San Pablo. Elsevier Editora Lta. Cuarta edición. 393-462 p.
20. Duran Fernández, V (2012). "Evolución y perspectivas de las cadenas agropecuarias en 2012". Anuario Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca 2012. Disponible en: www.mgap.gub.uy/opyppublicaciones/ANUARIOS/Anuario2012/material/pdf/02.pdf. Fecha de consulta: 25 de julio de 2016.
21. Elfving S. (1980). Studies on the naturally occurring goitrogen 5-vinyl-2-thiooxazolidone. Metabolism and antithyroid effect in the rat. *Ann Clin Res.*; 28:1-47.
22. ELIKA. (2013). Viniltiooxazolidona. Sustancias indeciables 1, Alimentación animal. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. Disponible en: http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento130/Goitrina%202013_cast.pdf. Fecha de consulta: 25 de junio de 2016.
23. Falasca S; Ulberich A. (2010). La mostaza etíope (*Brassica carinata*) como cultivo energético en Argentina: para producir biodiesel o cultivo para biomasa. *Revista Geográfica del Instituto Panamericano de Geografía e Historia*. 148: 7 – 22.
24. FAO, (2008). Biocombustibles y agricultura: panorama técnico. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0100s/i0100s02.pdf>. Fecha de consulta 22 de julio de 2016.
25. FEDNA (2016). Disponible en: http://www.fundacionfedna.org/ingredientes_para_piensos/aceites-y-ole%C3%ADnas-de-origen-vegetal. Fecha de consulta 13 de octubre de 2016.
26. Fernández Ginés, J. M. (2008). Generación de subproductos de la industria agroalimentaria: situación y alternativas para su aprovechamiento y revalorización Alimentaria, N^o Esp: 39-42.
27. Fernández Mayer A (2014). "Transformación de subproductos y residuos de agroindustria de cultivos templados, subtropicales y tropicales en carne y leche bovina". *Boletín Técnico N^o20 (INTA)*. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/tablas_composicion_alimentos/120-

- [Transformacion de subproductos.pdf](#). Fecha de consulta: 25 de julio de 2016.
28. Getinet A., G. Rakow, J.P. Raney, R.K. Downey, (1997). Glucosinolate content in interspecific crosses of Brassica carinata whit B. juncea and B. napus. Plant Breed. 116: 39-46
 29. Gilies, J.C. (1993). Efecto de la suplementación con afrechillo de arroz sobre el rendimiento y la composición de la leche y sobre la ganancia de peso y la variación de la condición corporal en vacas lecheras. Tesis Facultad de Agronomía Universidad de la República. 79 pp.
 30. Green C.G, Ramans M. (1995) The status of biodiesel in the UK. En: Proc. 9th Int. Rapeseed Conf., Cambridge, Reino Unido, pp. 1354-1356
 31. Griffiths D.W.; Birch, A.N.E., Hillman, J.R., (1998). Antinutritional compounds in the Brassicaceae: analysis, biosynthesis, chemistry and dietary effects. J. Hort. Sci. Biotechnol, 73:1-18.
 32. Hangshu Xin, Peiqiang Yu (2014). Rumen degradation, intestinal and total digestion characteristics and metabolizable protein supply of carinata meal (a non-conventional feed resource) in comparison with canola meal. Animal Feed Science and Technology 191: 106–110.
 33. Haro, A; Fernández, J. M; Río Celestino, M; Velasco, L. (2002). Aceite de semilla de mostaza etíope con bajo contenido de ácido linolénico. Disponible en: http://www.espatentes.com/pdf/2168046_a1.pdf. Fecha de consulta: 23 de junio de 2016.
 34. IMPO, (1996). Centro de Información Oficial. Normativas y Avisos Legales del Uruguay. Decreto N° 139/996. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/139-1996>. Fecha de consulta: 25 de julio de 2016.
 35. INALE, (2014). Primeros resultados de la encuesta lechera Disponible en: www.inale.org/innovaportal/v/4086/4/innova.front/primeros-resultados-de-la-encuesta-lechera-inale-2014.html. Fecha de consulta: 18 de mayo de 2016.
 36. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, (2002). Los subproductos agroindustriales en la alimentación de los rumiantes. Disponible en: http://www.agro.uba.ar/sites/default/files/agronomia/subproductos_suplementacion.pdf. Fecha de consulta: 18 de julio de 2016.
 37. Kirkegaard, J. A., Sarward M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. Plant Soil 201: 71-89.
 38. Leng, R.A, Preston, T.R. (2003). Diagnóstico general y tendencias en relación con la ganadería y el medio ambiente. ACPA 2: 34.
 39. Luna, M.L; Roldán, V.P; Bértoli, J; Acevedo, C.O; Bellezze, J; Manni, C.L; Von Der Thusen, S. (2013). Determinación de ácidos grasos no esterificados en suero de bovinos durante la transición a la lactancia. XIV Jornadas de Divulgación Técnico-Científicas. Jornada Latinoamericana Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de Rosario. Disponible en: <http://www.fveter.unr.edu.ar/jornadas2013/101.LUNA,M.%20VET-UNL%20Determinaci%F3n%20de%20%E1cidos....pdf>. Fecha de consulta: 23 de junio de 2016.

40. Marillia F.E, Francis T, Falk F, Smith M, Taylor D.C. (2014). Palliser's promise: Brassica carinata, an emerging western Canadian crop for delivery of new bio-industrial oil feedstocks. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 65:74.
41. Martinio, D.L, Ponce de León, F. (1999). Canola: una alternativa promisorio. INIA serie técnica N° 105, 98 p. Disponible en: www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2848/1/111219240807140032.pdf. Fecha de consulta: 12 de junio de 2016.
42. Meikle A, Cavestany D, Carriquiry M, Adrien ML, Artegoitia V, Pereira I, Ruprecht G, Pessina P, Rama G, Fernández A, Breijo M, Laborde D, Pritsch O, Ramos JM, de Torres E, Nicolini P, Mendoza A, Dutour J, Fajardo M, Astessiano AL, Olazábal L, Mattiauda D, Chilbroste P (2013). Avances en el conocimiento de la vaca lechera durante el período de transición en Uruguay: un enfoque multidisciplinario. *Agrociencia* 17 (1):141-152.
43. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca., DIEA (2014). Anuarios Estadísticos Agropecuarios 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2014/Diea-Anuario%202014-Digital01.pdf>. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2016.
44. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca., DIEA (2015). Regiones Agropecuarias del Uruguay. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/dieaanterior/regiones/Regiones2015.pdf>. Fecha de consulta: 3 de mayo de 2016.
45. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca., DIEA (2015). Anuarios Estadísticos Agropecuarios 2015. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/Dieaanterior/Anuario2015/DIEA-Anuario2015-01web.pdf>. Fecha de consulta: 5 de mayo de 2016.
46. Mithen, R. (2001). Glucosinolates-biochemistry, genetics and biological activity. *Plant Growth Regulation*, 34: 91-103.
47. Murillo G, R.G. Mehta (2001). Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutr. Cancer* 41: 17-28.
48. Nanda-Kumar, P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D. (1995). The use of crop Brassica phytoextraction: a subject of phytoremediation to remove toxic metals from soils. *Proceedings of the 9th International Rapeseed Conference*. Cambridge, Reino Unido, p. 753-756.
49. Newman, S., Confer, A.W., Panciera, R.J. (2009). Sistema Urinario. En: McGavin, M.D., Zachary, J.F. *Bases de patología en veterinaria*. San Pablo. Elsevier Editora Lta. Cuarta edición. 613-692 p.
50. Normativa y Avisos Legales del Uruguay, (1996). Disponible en: <http://www.impo.com.uy/bases/decretos/139-1996/1>. Fecha de consulta: 8 de abril de 2016.
51. Ojeda, F, Cáceres, O. (2002). Principales avances en la utilización de los subproductos agroindustriales. *Pastos y Forrajes* 25 (1).
52. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Publicaciones FAO. Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/la-cadena-lactea/cuestiones-sociales-y-de-genero/es/#.V2GoAKLNKik>. Fecha de consulta: 25 de junio de 2016.
53. Parsi J.; Godio L.; Miazzi R.; Maffioli R.; Echevarria A, Provenzal P. (2001). Valoración nutritiva de los alimentos y formulación de dietas. Disponible en:

- <http://www.academia.edu/10331881/VALORACION NUTRITIVA DE LOS ALIMENTOS Y FORMULACION DE DIETAS>. Fecha de consulta: 19 de julio de 2016.
54. Pigurina G, Methol M, (2004). Tabla de Contenido Nutricional de Pasturas y Forrajes del Uruguay. Guía de la Alimentación de Ruminantes. Disponible en: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219240807141556.pdf>. Fecha de consulta: 15 de julio de 2016.
 55. Plascencia, A., Mendoza, G.D., Vázquez, C. Avery, R. (2005). Factores que influyen en el valor nutricional de las grasas utilizadas en las dietas para bovinos de engorda en confinamiento: una revisión. *Interciencia*: 30(3). Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03781844200500300006. Fecha de consulta: 3 de julio de 2016.
 56. Provenza, F. D., (1996). Acquired aversions as the basis for varied diets of ruminants foraging on rangelands. *J. Anim. Sci.* 74: 2010-2020.
 57. Provenza, F.D., J.J. Villalba. (2006). Foraging in Domestic Vertebrates: Linking the Internal and External Milieu. In *Feeding in Domestic Vertebrates: From Structure to Function*. V.L. Bels, ed. CABI Publ., Oxfordshire, UK. P 210-240.
 58. Radostitis O.M, Mayhew I.G, Houston M.D, (2002). Examen y Diagnostico Clínico en Veterinaria. Ciudad, Elsevier, 771p.
 59. Rosenberger, G. (1977). Exploración Clínica de los Bovinos. Berlín, Paul Parey, p. 93-273.
 60. SERVET, Servicios Microbiológicos. Disponible en: <http://proclave.com/servet/valoresref.htm>. Fecha de consulta: 7 de agosto de 2016.
 61. Stockham, S.L., Scott, M. A. (2008). Fundamentals of veterinary clinical pathology. 2a ed. Ciudad, Wiley-blackwell. 920 p.
 62. Suzuki, C., Ohnishi-Kameyama, M., Sasaki, K., Murata, T., Yoshida, M. (2006). Behavior of Glucosinolates in Pickling Cruciferous Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9430-9436.
 63. Van Vleet, J.F., Ferrans, V.J. (2009). Sistema cardiovascular. En: McGavin, M.D., Zachary, J.F. Bases da patología em veterinaria. San Pablo. Elseiver Editora Lta. Cuarta edición. 559-612 p.
 64. Viera E.; Bengoa F.; Bagnato G.; Arboleya I. (2013). El sector lechero Uruguayo. Contribuciones de las políticas públicas y la institucionalidad sectorial a su desarrollo. Reunión especializada de Agricultura Familiar (REAF) – PPTV. Seminario sobre Producción, Comercialización y Políticas Públicas para la Seguridad Alimentaria 16p. Disponible en: http://fidamercosur.org/site/images/BIBLIOTECA/2013/Publicaciones/El_sector_lechero_uruguayo.pdf. Fecha de consulta: 5 de junio de 2016.
 65. Wade, K. L., Garrard, I. J., & Fahey, J. W. (2007). Improved hydrophilic interaction chromatography method for the identification and quantification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2):469-472.