

SINDROME CAIDA DEL GANADO-CONTRIBUCION A SU ESTUDIO*

Enrique Trheebilcock P.
Fernando Villafañe A.
Arturo Gil P.**

1. INTRODUCCION

Muchos ganaderos del Valle del Sinú y de la Sabana de Sucre, basados en observaciones de campo, indican como causa del síndrome denominado "Caída del ganado", algunas plantas y malezas propias de estas regiones, concepto compartido por médicos veterinarios que trabajan en fincas localizadas en la región.

Este síndrome "Caída del ganado", muchas veces produce mortalidad en los ganados y es causa de pérdidas económicas. Ocorre tanto en épocas de sequía como en épocas de lluvia; se presenta con mayor frecuencia cuando caen las primeras lluvias, después de un intenso verano.

En cuanto a la etiología de esta entidad, se han realizado estudios en los que se implica como causa al ácido cianhídrico presente en plantas que presumiblemente consume el ganado (Banco Ganadero, 1976; Gómez, 1970). En el presente trabajo se ha investigado esta situación desde el punto de vista de los nitratos y nitritos considerando el hecho de que ciertas plantas bajo condiciones edáficas y ambientales propicias acumulan cantidades de nitratos las cuales en ciertas épocas resultan tóxicas al ser ingeridas por bovinos.

Con este estudio se pretendió obtener datos que permitieran conocer las concentraciones relativas de nitratos que pueden llegar a tener ciertas plantas de la región, en dos épocas del año, la cuantificación y tiempos de liberación de estos compuestos en el rumen y la acción ejercida por ellos en la formación de niveles de metahemoglobina, y algunos aspectos de la posible patogénesis de esta enfermedad.

2. REVISION DE LITERATURA.

Muchos experimentos indican que el amonio es uno de los primeros, sino el primero, de los productos biológicos de la fijación del nitrógeno en los suelos, el cual no es acumulado por los microorganismos que normalmente llevan a cabo este proceso, ya que ellos lo utilizan para elaborar otros compuestos nitrogenados. El nitrógeno en el suelo es transformado a amonio, el cual se oxida de inmediato a ión nitrato (NO_3^-). Este proceso se llama nitrificación (Conn and Stumpf, 1969).

El nitrato es absorbido del suelo por las plantas las cuales lo convierten en proteínas y otros compuestos nitrogenados (Smith and Jones, 1962).

* Contribución del Programa para Graduados en Ciencias Agrarias (Universidad Nacional-ICA) y el Programa de Patología-Toxicología de la División de Ciencias Veterinarias del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Adaptación y resumen de la Tesis de Grado presentada por el autor a dicho Programa como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiae.

** Respectivamente: Médico Veterinario, M.S., Programa de Patología-Toxicología, LIVET-ICA, A.A. 206, Montería, Colombia; Médico Veterinario Ph.D., Director Nacional Programa de Patología-Toxicología, LIMV-ICA, A.A. 29743, Bogotá, Colombia; Químico Farmacéutico, Ph.D., Director Nacional Programa de Nutrición Animal, Tibaitatá, ICA, A.A. 151123, Bogotá, Colombia.

Normalmente son pocas las plantas que tienen un contenido alto en nitrato; sin embargo, bajo condiciones tales como gran cantidad de materia orgánica putrefacta en los suelos, acidez de los mismos, aplicaciones de fertilizantes nitrogenados, etc., muchas plantas acumulan grandes cantidades de estas sustancias que son potencialmente tóxicas para los ganados (Edds, 1975; Manual Merk de Veterinaria, 1970).

Los nitratos por sí solos son relativamente poco tóxicos, pero su importancia como causa de envenenamiento radica en el hecho de ser transformados a nitritos (NO_2^-) por los microorganismos del rumen. El nitrito es un producto intermedio de la reducción del nitrato a amonio en el rumen de bovinos y ovinos, pero parece que al llegar a cierta concentración de nitratos, la rata de reducción del nitrito se limita y en consecuencia éste se acumula (Asbury and Rhode, 1964; Lewis, 1948).

Los nitratos al ser absorbidos por la corriente sanguínea se combinan con la hemoglobina, oxidándola y pasándola a la forma férrica o metahemoglobina, la cual no cede oxígeno a los tejidos. Este proceso conduce a hipoxia de diferentes grados en proporción a la cantidad de metahemoglobina formada (Garner, 1967; Radeleff, 1964).

Algunos autores (Del Río, 1970; Radeleff, 1964), concuerdan en estimar la dosis letal mínima de nitrato sódico para bovinos, entre 0,65 a 0,75 gramos por kilogramo de peso, y que dosis de un gramo de nitrato potásico por kilogramo de peso es letal para bovinos y ovinos.

Otros investigadores (Bjorson *et al.*, 1960; Case, 1957), afirman que plantas cuyo contenido sea mayor de 1,5% de nitrato, expresado como nitrato de potasio, en base a materia seca, son potencialmente tóxicas. Algunas plantas han sido consideradas tóxicas si ellas contienen 15.000 partes por millón de nitrato potásico.

La presentación de síntomas es repentina, empezando con diarrea que progresa rápidamente, respiración disneica con esfuerzos respiratorios violentos, debilidad, ataxia, cianosis progresiva, baja de la presión sanguínea, estupor, coma y parálisis respiratoria. La muerte puede ocurrir una hora después de la presentación de los síntomas, pero generalmente sucede luego de varias horas (Blood and Henderson, 1965; Tucker *et al.*, 1961).

Las lesiones ocasionadas por esta alteración, corresponden a una prolongada hipoxia, a nivel de tráquea y bronquios se observan hemorragias en la mucosa como consecuencia del proceso anóxico, en el saco pericárdico hay generalmente líquido sanguinolento y las superficies serosas pueden hallarse hemorrágicas (Edds, 1975).

3. MATERIALES Y METODOS.

Inicialmente se seleccionaron, con base en su contenido alto de nitratos, cuatro plantas entre la mayoría de las que crecen durante la época en que ocurre el síndrome. Las especies escogidas fueron: Cansaviejo (*Mascagnia concinna*), Anamú (*Petiveria alliacea*), Verbena (*Heliotropun indicum*) y el pasto guinea (*Panicum maximum*). Posteriormente se identificaron en los potreros áreas de aproximadamente 5 metros de diámetro donde se realizó la recolección de material vegetal tanto en Córdoba como en Sucre, durante dos épocas del año, como fueron al final del verano (última quincena de marzo y primera de abril), y la iniciación del invierno (finales de abril). De cada planta se tomó la parte superior del tallo y las hojas. Este material vegetal se guardó en bolsas plásticas y se llevó al laboratorio para su respectivo análisis cuantitativo.

Las cuantificaciones de NO_3^- y NO_2^- fueron hechas siguiendo el método fotocolorimétrico descrito por Larin y Harris (1970), se utilizó un espectrofotómetro Coleman Junior II Modelo 6/35. El principio de este método consiste en que el nitrato es reducido a nitrito por el zinc y el sulfato de manganeso, y su posterior diazotización con ácido sulfanílico y acoplamiento con 1-naftilamina para formar un compuesto rojizo.

Los suelos donde fueron tomadas estas plantas tienen pH ligeramente ácido y contenido de materia orgánica comprendido entre 2,5 y 3,5%; los niveles de fósforo y potasio son normales, (20-30 ppm y 0,15-0,30 meq/100 g, respectivamente), respondiendo bien a las aplicaciones de nitrógeno. La temperatura promedio es de 28 a 30°C, con una precipitación pluvial anual aproximada de 1.200 a 1.300 mm.

La segunda fase del estudio consistió en determinar la cinética (Relación de NO_3^- y NO_2^- en solución contra tiempo de incubación) de la liberación de estos iones a medida que las plantas eran digeridas por bacterias ruminales en un sistema de cultivo *in vitro*.

Con tal fin, una muestra de las plantas se secó a 65°C hasta un 10% aproximado de humedad y se molió a malla No. 40. Cinco gramos de materia seca de cada planta se transfirió a frascos fermentadores de 1.000 ml, a los cuales se adicionó un medio de pH regulado con urea y sales minerales, y se incubaron a 40°C con burbujeo de CO_2 continuo.

De cada uno de los frascos fermentadores se tomaron alícuotas de sobrenadante (10 ml) a intervalos de quince minutos durante la primera hora; treinta minutos entre la primera y tercera hora y sesenta minutos de la tercera a la séptima hora, momento en el cual se suspendió el proceso. El

procedimiento empleado fue una adaptación de la primera parte de la técnica de digestibilidad *in vitro* indicado por Larin y Harris, 1970.

La última etapa experimental del trabajo, consistió en administrar oralmente a cuatro bovinos jóvenes una dosis aproximada de 40 gramos de NO_3^- tomada en base a las concentraciones de esta sustancia en cada una de las cuatro plantas en estudio.

Los ensayos se repitieron en forma alterna cada tercer día, rotando plantas y animales. Esto fue hecho de manera que cada uno de los animales recibiera todas las plantas con las que se trabajó. Cada ensayo duró 24 horas. Antes del ensayo respectivo, los animales fueron aislados individualmente durante 15 horas, sometidos a completo ayuno. Después se administró únicamente la dosis de NO_3^- y agua desmineralizada a voluntad.

Se recolectó sangre para determinación de metahemoglobina en cada uno de estos bovinos a la hora cero o sea en el momento de administrar el vegetal, y cada dos horas hasta la hora diez. Las mediciones de metahemoglobina se hicieron siguiendo el método descrito por Evelyn y Malloy, 1938.

Los datos se analizaron estadísticamente de acuerdo a su naturaleza así: en la primera parte del trabajo las plantas recolectadas en las dos épocas fueron consideradas como dos tratamientos (T_1 verano y T_2 invierno). De cada tratamiento se hicieron cinco replicaciones (plantas individuales) por especie. Los promedios por época fueron sometidos a un análisis de varianza, utilizando un diseño por bloques al azar, bloqueando por planta individual de donde provino el material de cada especie.

Para el estudio de la cinética de la liberación digestiva de NO_3^- y NO_2^- se efectuó un análisis de regresión simple. Se utilizó como variable independiente (x) el tiempo a que se tomaron las alícuotas de sobrenadante y como variable dependiente (Y) las concentraciones de nitratos y nitritos para cada una de las especies vegetales.

En la última parte del estudio los valores de metahemoglobina se analizaron como un cuadrado latino incompleto con cuatro tratamientos (plantas) y cuatro animales, con tres replicaciones en el tiempo y rotando los tratamientos entre los animales en cada replicación. El análisis de varianza comprendió la descomposición de la fuente de variación, horas, en sus efectos lineal y cuadrático. Además se hizo una prueba de comparación múltiple (test de Duncan) para cada una de las fuentes de variación.

4. RESULTADOS.

En la primera parte del estudio y como se puede observar en la Tabla 1, las concentraciones promedio de nitratos difieren significativamente ($p < 0.01$) para tres plantas (Cansaviejo, Anamú, Verbena) en relación a las dos épocas de recolección.

Para el pasto guinea, a diferencia de las otras plantas, las concentraciones de nitratos en las dos épocas del año no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). No obstante la cantidad promedio encontrada en la iniciación del invierno fue mayor a la observada en el verano (Tabla 1).

En la segunda fase de la investigación se observó que todas las plantas por acción de la microflora empezaron a liberar nitratos entre los 90 y 150

TABLA 1. Concentraciones promedio* de nitratos en miligramos por kilogramo de material vegetal fresco halladas en cuatro plantas durante dos épocas del año.

Planta	Epoca de Recolección	Promedios de NO_3^- (mg/kg)
Cansaviejo (<i>Mascagnia concinna</i>)	Verano	1555,20
	Inic. Invierno	10763,00
Anamú (<i>Petiveria alliacea</i>)	Verano	1155,20
	Inic. Invierno	7867,60
Verbena (<i>Heliotropun indicum</i>)	Verano	177,60
	Inic. Invierno	7194,60
Guinea (<i>Panicum maximum</i>)	Verano	1209,20
	Inic. Invierno	5260,00

* Cada cifra es el promedio de 5 determinaciones correspondientes a 5 plantas por especie.

minutos después de iniciado el proceso de digestión *in vitro* (Tabla 2). En la misma tabla se puede observar que la mayor concentración promedio de nitrito (a partir del nitrato que le dio origen), ocurrió para todas las plantas después de las cuatro horas de iniciadas las fermentaciones; de donde se deduce que el nitrato es el metabolito precursor del nitrito.

No se encontró una relación lineal o cuadrática ($p > 0.05$) entre el tiempo de fermentación y las concentraciones de nitrato correspondientes. En contraste la aparición progresiva de los nitritos en tres plantas (Anamú, Verbena, Guinea), evidenció

una relación cuadrática significativa ($p < 0.01$) entre estas dos variables.

La última fase del trabajo mostró que la ingestión de la misma cantidad de NO_3^- en base a la concentración del ión en cuatro diferentes plantas causan promedios de metahemoglobina significativamente ($p < 0.01$) distintos para las plantas (Tabla 3). En efecto, el promedio para el Cansaviejo fue significativamente mayor ($p < 0.01$) que para las demás plantas, en tanto que el promedio para el pasto guinea fue significativamente ($P < 0,01$) menor (Tabla 4).

TABLA 2. Cinética de la liberación de NO_3^- y NO_2^- *in vitro* para cuatro plantas*, **.

Tiempo de Fermentación Minutos	Cansaviejo (<i>Mascagnia concinna</i>)		Anamú (<i>Petiveria alliacea</i>)		Verbena (<i>Heliotropun indicum</i>)		Guinea (<i>Panicum maximum</i>)	
	Nitratos	Nitritos	Nitratos	Nitritos	Nitratos	Nitritos	Nitratos	Nitritos
15								
30								
45								
60								
90			249,28	794,33				
120	3519,27		813,35	1590,78				
150	1178,11	5054,91	885,17	4161,62	1021,39		1577,59	803,76
180	2349,77	5304,75	2112,59	5404,03	1300,52	2993,89	1896,10	3001,27
240	1406,41	5306,91	2344,98	6677,92	3206,86	6020,87	1695,16	4234,71
300	1354,72	5209,99	1062,63	5184,32	2212,33	4875,42	1581,86	4863,18
360	1417,18	3782,03	629,55	3637,89	1534,16	3434,29	1861,90	4155,62
420	1268,57	3198,36	646,45	1943,59	256,38	1848,44	1111,58	2917,91

Para ninguna planta hubo liberación entre los 15 y 60 minutos.

* Cada cifra es el promedio de tres experimentos (digestiones) hechas a intervalos de una semana aproximadamente. Las cifras corresponden a miligramos/kg de materia seca del forraje.

** A los tiempos indicados se obtuvo una alícuota de 10 ml del medio de cultivo líquido (600 ml) donde se degradaban bacteriamente 5 gramos de materia seca de cada planta. Sobre la alícuota se determinaron NO_3^- y NO_2^- .

TABLA 3. Análisis de varianza con descomposición de la fuente de variación, horas, en sus efectos lineal y cuadrático, para los valores de metahemoglobina en 4 animales que ingirieron 4 diferentes plantas.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	F
Ensayos	2	1,989	0,663	4,88*
Animales	3	0,198	0,066	0,49
Tratamientos	3	10,899	3,633	26,71*
Horas	5	34,852	6,970	51,25*
Efecto lineal	1	4,271	4,271	31,40*
Efecto cuadrático	1	15,005	17,005	125,04*
Horas por tratamiento	15	16,026	1,068	7,85*
Error	66	8,9798	0,136	—
Total	95	72,9438	—	—

* Alta significancia.

TABLA 4. Análisis de Duncan para los promedios de metahemoglobina correspondiente a 4 animales que consumieron 4 plantas (tratamientos), en 4 ensayos (replicaciones).

Promedios Tratamientos				
Cansaviejo 4.07	Anamú 3.79	Verbena 3.71	Guinea 3.14	
—	—	—	—	} p < 0.01
Promedio Ensayos				
I 3.85	II 3.77	III 3.59	IV 3.49	
—	—	—	—	} p < 0.01
—	—	—	—	
				} p < 0.05

Las diferencias entre horas fueron altamente significativas ($p < 0.01$) para los tratamientos Verbena, Anamú y Cansaviejo (Tabla 5), debido a la respuesta cuadrática de los niveles de metahemoglobina contra tiempo (Tabla 3). Así mismo se pudo ver en la Tabla 5 que el mayor valor promedio de metahemoglobina para estas tres plantas ocurrió a la sexta hora. También se observa en la misma tabla que el mayor promedio general de metahemoglobina por horas para todas las plantas ocurrió en la sexta hora.

5. DISCUSION.

Las experiencias expuestas en este trabajo se realizaron para examinar la hipótesis de que ciertas plantas del Valle del Sinú y de la Sabana de Sucre, acumulan bajo condiciones edáficas y ambientales propicias, concentraciones de nitratos hasta un grado potencialmente tóxico para los ganados que las ingieran.

Los resultados sobre cantidades de estas sustancias en las cuatro plantas implicadas (Anamú, Cansaviejo, Guinea, Verbena), muestran una marcada diferencia de una época de recolección a la otra. El verano en las dos zonas citadas anteriormente es muy intenso, y causa una extrema sequía en las tierras y pastos.

Las plantas recolectadas en el verano se encontraron en estado de lignificación y mostraron niveles de nitratos tan bajos que en ningún momento inducen a pensar que fueron causa de intoxicación por estos compuestos. Una vez empezó a llover la vegetación cambió y al analizar las plantas se encontró en cada una de ellas niveles muy altos de nitratos.

La experiencia de los Veterinarios y ganaderos de la zona indica que es a la iniciación del invierno cuando ocurre con frecuencia el síndrome. Faltaría comprobar que el síndrome en mención es causado por nitratos, lo cual no fue parte de los objetivos de este trabajo. Sin embargo, los resultados de la pre-

TABLA 5. Promedios de metahemoglobina (%) en animales que consumieron cuatro plantas en función de tiempo después de la ingestión.

Horas	Porcentaje de Metahemoglobina				Promedio General (%)
	Verbena	Guinea	Anamú	Cansaviejo	
0	3,09	3,11	3,03	3,12	3,08
2	3,25	3,14	3,17	3,17	3,18
4	3,97	3,10	3,88	4,05	3,75
6	4,72	3,11	5,39	6,23	4,86
8	3,93	3,20	3,92	4,38	3,85
10	3,29	3,22	3,32	3,45	3,32

sente investigación, son básicos para la iniciación de nuevos estudios al respecto. De todas formas es importante tener en cuenta el cuidado en eliminar las malezas de los potreros, lo mismo que utilizar sustancias reductoras como azul de metileno en la sal mineralizada, con el fin de impedir la posible presentación de este tipo de intoxicación.

La segunda fase de la investigación sirvió para establecer que los vegetales estudiados empiezan a liberar nitratos entre la hora y media y dos horas y media después de iniciada la digestibilidad *in vitro*. Se observó también en todas las plantas un aumento máximo de los niveles de nitritos libres entre la cuarta y quinta hora acompañado de un descenso paulatino en las concentraciones de nitratos.

Al hacer ingerir a bovinos, en la última parte del trabajo, una cantidad de planta que contuviera 40 gramos de NO_3^- , se pudo constatar que el pasto guinea no causó incremento alguno de la metahemoglobina en los cuatro animales usados. Basados en los resultados de los ensayos *in vitro* lo anterior hace suponer que la liberación del NO_3^- de esta gramínea, ocurre en el rumen en una forma lenta, lo cual permite a la flora microbiana metabolizarlo sin ocasionar acumulación de NO_2^- .

Las otras tres plantas administradas a los bovinos (Cansaviejo, Verbena, Anamú), causaron un aumento significativo mayor, en el promedio de metahemoglobina en relación con el observado para el Guinea. Se comprobó además, que existe una relación directa entre la cantidad de nitratos totales y la rata de liberación de nitritos a partir de los nitratos, con los niveles de metahemoglobina formados. En efecto, los niveles de metahemoglobina alcanzaron su máxima elevación a la sexta hora, lo cual coincide con las máximas concentraciones de NO_2^- liberadas *in vitro* a la cuarta hora, permitiendo deducir por consiguiente que esta absorción es muy rápida. No hay, sin embargo, manera de relacionar estos hallazgos con el síndrome "Caída del ganado", ya que los animales experimentales no sufrieron síntomas de intoxicación ni los niveles de metahemoglobina alcanzados fueron causa de disturbios patológicos.

6. RESUMEN.

Cuatro plantas propias del Valle del Sinú, en el departamento de Córdoba, y de la Sabana de Sucre, en el departamento del mismo nombre, fueron identificadas como acumuladoras de NO_3^- mediante una prueba cualitativa. Las plantas utilizadas en el presente estudio fueron: Cansaviejo (*Mascagnia concinna*), Anamú (*Petiveria alliacea*), Verbena (*Heliotropun indicum*) y el pasto Guinea (*Panicum maximum*).

Los análisis cuantitativos mostraron que existe una diferencia significativa ($p < 0.01$) entre los niveles de NO_3^- a finales del verano y a comienzos de invierno.

La segunda fase del estudio consistió en determinar la cinética de liberación de los nitratos y conversión de éstos en nitritos al poner a digerir *in vitro* los materiales vegetales. Se observó que los nitratos empezaron a ser liberados entre la hora y media y dos horas y media de digestión. El punto máximo de acumulación de nitritos provenientes de la reducción de los nitratos fue aproximadamente a la cuarta hora y luego descendió paulatinamente.

En la última etapa se administró oralmente a cada uno de cuatro bovinos de año y medio de edad, una dosis de 40 gramos de NO_3^- , tomada en base al contenido en el material vegetal fresco. Se observó que tres de estas plantas (Cansaviejo, Anamú, Verbena) hicieron elevar la metahemoglobina. Esta sustancia logró una máxima elevación a la sexta hora, siguiendo posteriormente un descenso en su concentración para luego estabilizarse a la décima hora.

7. SUMMARY.

Cattle fall syndrome. A contribution to its study.

Four plants native of the Sinú Valley in the state of Córdoba ant the Sucre Savannah, in the state of Sucre, were identified through a cualitative test as NO_3^- accumulators. The plants studied were: Cansaviejo (*Mascagnia concinna*), Anamú (*Petiveria alliacea*), Verbena (*Heliotropun indicum*) and Guinea Grass (*Panicum maximum*).

Quantitative analysis on these plants showed NO_3^- values to be significantly higher ($p < 0.01$) at the end of the summer than at the beginning of the winter.

The second phase of the study consistend in determining the release kinetics of nitrates and the reduction to nitrites when the vegetal material was digested *in vitro*. It was observed that the nitrates began to be released between one and half and two and a half hours of digestion. The peak nitrite release occurred by the fourth hour and then decreased rapidly.

Finally, a dose of 40 g of NO_3^- was given orally in the form of plants, and half year old calves. The dose was calculated by weighing fresh vegetal material. It was observed that three of these plants (Cansaviejo, Verbena, Anamú) produced elevation of metahemoglobin. This substance reached a maximum concentration by the sixth hour, followed by a decreased, and then leveled by the tenth hour.

8. BIBLIOGRAFIA.

1. ASBURY, A.C. and RHODE, E.A. Nitrite intoxication in cattle, effects of lethal doses of nitrite on blood pressure. *Am. J. Vet. Res.* 25:1010-1013, 1964.
2. BANCO GANADERO. Investigación sobre el problema conocido en Sabanas de Bolívar con el nombre de "Caída del ganado". *Temas de Orientación Agropecuaria.* 115-116:5-24. 1976.
3. BLOOD, D.C. and HENDERSON, I.A. *Medicina Veterinaria.* Traducida por Jaime Roig. 2 ed. México, Interamericana. 1965. pp. 887-889.
4. BJORSON, C.B.; McLLWAIN, P.K.; EVELET, D.T. and BOLIN, F.M. Nitrate poisoning in livestock. *North Dakota, Agric. Exper. Sta.* 1960. pp. 1-4. (Circ. No. 34).
5. CASE, A.C. Some aspects of nitrate intoxication in livestock. *J.A.V.M.A.* 130: 323-329. 1957.
6. CONN, E.E. and STUMPF, P.K. *Bioquímica Fundamental.* 2 ed. México, Limusa. 1969. pp. 378-383.
7. DEL RIO, I. Anotaciones sobre toxicología, Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria. 1970. pp. 84-93. (Mimeografiado).
8. EDDS, G.T. Conferencias de toxicología ambiental y salud pública. Universidad de Florida. Traducidas por Orlando Osuna. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina Veterinaria, 1975. p. 25 (Mimeografiado).
9. EVELYN, K.A. and MALLOY, H.T. Microdetermination of Oxihemoglobin, Methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.* 126:655-662. 1938.
10. GARNER, R.D. *Veterinary Toxicology.* 3 ed. Baltimore, Williams and Wilkins, 1967. pp. 108-111.
11. GOMEZ, B. *Mascagnia concinna.* Planta tóxica del ganado vacuno. Tesis M.S. Bogotá, Universidad Nacional de Colombia-ICA, 1970. 46 p. (Mecanografiado).
12. LARIN, E. and HARRIS, B.S. Métodos para el análisis químico y la evaluación biológica de alimentos para animales. Gainesville, Universidad of Florida, 1970. pp. 4901-4907.
13. LEWIS, D. The metabolism of nitrate and nitrite in the sheep; the reduction of nitrate in the rumen of the sheep. *Bioch. J.* 486:175-180. 1948.
14. *MANUAL MERCK DE VETERINARIA.* 1 ed. Rahway. N.J. Merck, 1970. pp. 813-816.
15. RADELEFF, R.D. *Veterinary Toxicology.* Philadelphia, Lea and Febiger, 1964. pp. 154-156.
16. SMITH, H. and JONES, T. *Patología Veterinaria.* Traducida por Manuel Chavarría. México, Uteha, 1962. pp. 636-638.
17. TUCKER, J.M.; CORDY, D.R.; BERRY, L.J.; HARVEY, W.A. and FULLER, T.C. Nitrate poisoning in livestock. University of California, California Agricultural Station, 1961. pp. 3-10. (Circ. No. 506).