

Compuestos generados durante la fermentación de ensilaje de trébol rosado y su efecto en el consumo de ovinos y bovinos¹

Darwins Castillo A.², Claudio Ciudad B.³ y Hernán Rivadeneira A.⁴

INTRODUCCION

En general los ensilajes de leguminosas han dado mejores resultados en la Estación Experimental La Platina que en otros lugares del mundo (Devilat, 1967, Wernli y Romero, 1967). El ensayo de Ruiz y Carrillo (1965)

¹Parte de la tesis del autor principal para optar al título de Químico-Farmacéutico de la Universidad de Chile. Recepción originales, 20 de mayo de 1971.

²Químico-Farmacéutico.

³Bioquímico. Lab. de Bromatología. Estación Experimental La Platina, INIA. Casilla 5427, Santiago, Chile.

⁴Ing. Agr. M. S., Producción Bovina. Estación Experimental La Platina, INIA. Casilla 5427, Stgo., Chile.

también ha contradicho la literatura extranjera, que muestra los ensilajes de leguminosas de menor calidad que otros como, por ejemplo, el de maíz.

La razón para las fluctuaciones en calidad de los ensilajes de leguminosas se la asignan al bajo contenido de carbohidratos solubles y alto contenido de humedad y proteína que tienen estas plantas (Kirchgesner e Hirsch, 1964). Sin embargo, no es mucho el estudio que se ha hecho en el mundo con ensilaje de trébol rosado, debido principalmente a la escasa predominancia de esta forrajera en las mezclas usadas en el extranjero.

Thomas *et al.* (1961) han demostrado que todos aquellos productos provenientes de la fermentación de carbohidratos, tales como los ácidos orgánicos, no reducen siempre el consumo, ni aún el ácido butírico, responsable del olor desagradable del ensilaje mal hecho. Por otra parte se ha determinado por Hawkins, Henderson y Purser (1970) que el consumo de ensilajes de gramíneas y leguminosas es inversamente proporcional al contenido de humedad de ellos. Esto, más que nada se debe a los distintos procesos fermentativos que ocurren con cada humedad y no por el contenido de materia seca del alimento mismo (Thomas *et al.*, 1961).

Por último, otro factor importante como las proteínas pueden influir en el consumo. Según Barnett (1954), por acción enzimática, las proteínas dejan una gran cantidad de aminoácidos libres. Al producirse en el ensilaje un alza de pH, estos aminoácidos sufren tres procesos de ruptura: desaminación, transaminación y descarboxilación. Con respecto a los compuestos que se forman en la desaminación de aminoácidos, Neumark, Bondi y Volcani (1964) observaron que ensilajes con alto contenido de aldehídos y bajo contenido de cetoácidos caracterizan una baja palatabilidad.

Se ha postulado, según Hughes (1969) que la baja palatabilidad de ciertos ensilajes pudiera estar relacionada a cambios en los componentes de la fracción nitrogenada soluble no proteica. Voss (1966) suponiendo que productos de rompimiento de proteínas puedan influenciar desfavorablemente en la palatabilidad del ensilaje, investigó la formación de aminas y amoníaco. Neumark *et al.* (1964) observaron que la triptamina del ensilaje indica formación de metabolitos que deprimen el apetito a los rumiantes y que la histamina acrecenta la acción depresiva del apetito que tiene el formaldehído. Mac Pherson y Violante (1966) mostraron que el contenido de histamina y tiramina en ensilaje de pasto ovillo, fue más alto que en pasto fresco y, en algunos casos, las ovejas que comían estos ensilajes exhibían una pérdida del apetito. Okamoto, Miller y Moore (1964) observaron que no hay relación entre la concentración de histamina en el ensilaje y el consumo. Jackson (1964) sugiere que para evaluar un ensilaje debiera determinarse solamente la cantidad de bases volátiles totales (aminas volátiles y amoníaco) presentes, ya que éstas indican el grado de rompimiento de aminoácidos puestos en libertad en la proteólisis.

En el presente estudio se pretende determinar si hay diferencias cualitativas entre los diferentes compuestos obtenidos en los ensilajes de trébol rosado, realizados con distintos

estados de madurez y grado de marchitamiento, y se analizará si existe correlación entre estos compuestos, especialmente aminas no volátiles, y el consumo que de ellos hagan vacunos y ovinos.

MATERIALES Y METODOS

Con el fin de obtener ensilajes de distinta relación entre proteínas, carbohidratos solubles y humedad, se usaron cuatro ensilajes de trébol rosado hechos en distintos estados de madurez y con diferentes grados de marchitamiento: 1) Trébol rosado joven con 19,9% de materia seca; 2) Trébol rosado joven marchito con 25,9% de materia seca; 3) Trébol rosado maduro con 24,4% de materia seca; 4) Trébol rosado maduro marchito con 33,6% de materia seca.

El forraje se segó y preparó según fuera directo o marchito y, en el momento de ensilar se tomaron cuatro muestras representativas del trébol que se depositaba en cada silo, las que se secaron a 60°C. Luego se molieron y se pasaron por un tamiz de 1 mm.

El forraje se colocó en silos canadienses de madera, compactándolo mediante un tractor y sellando el silo con un plástico sobre el que se colocó una capa de tierra. Se mantuvo el forraje alrededor de noventa días en el silo hasta lograr estabilizar los procesos fermentativos. Al cabo de este tiempo se abrieron para realizar un ensayo de consumo de 30 días, utilizando vacunos y ovinos. Las muestras para análisis químicos fueron tomadas de cada silo una vez por semana durante estos 30 días.

Las cuatro muestras semanales de ensilaje se recolectaron en bolsas plásticas. Se separaron en tres submuestras: una para ser analizada en fresco, otra para ser secada a 60°C y la tercera se guardó a -20°C como contra-muestra.

Tanto al forraje seco como al ensilaje seco a 60°C se les practicó análisis proximal según AOAC (1964), de carbohidratos no estructurales totales según Smith (1969) y de almidón según Nelson (1944). El ensilaje fresco se sometió a los siguientes análisis: índice de acidez, materia seca, ácido acético, ácido butírico y ácido láctico, según Lepper (1951), amoníaco y nitrógeno total según AOAC (1964). Además se determinaron las siguientes aminas: triptamina, tiramina, beta-feniletilamina, 2-amino-etanol, histamina, putrescina y cadaverina por los métodos de Yoshinaga *et al.* (1961), Neumark *et al.* (1964) y Truter (1963), modificado por Castillo (1970).

El ensayo de consumo se efectuó simultáneamente con 5 novillos y 6 corderos por cada tratamiento. De los treinta días de ensayo,

hubo 15 días preexperimentales y los últimos 15 días experimentales para la estimación individual de consumo expresado en materia seca. El ensilaje se suministró en dos raciones diarias en un 10% en exceso del consumo de los dos días anteriores. Las sobras se sacaron una vez al día. Los datos de consumo se expresaron en gramos de materia seca por kilogramo de peso metabólico al día.

RESULTADOS Y DISCUSION

A. Composición química de la pradera.

El Cuadro 1 muestra que a medida que avanza la madurez del forraje aumenta el porcentaje de materia seca, fibra cruda, carbohidratos solubles y decrece proteína cruda y cenizas, al igual como lo señala la literatu-

Cuadro 1 — Composición química de la pradera (% en base materia seca).

PARAMETROS	P R A D E R A S			
	JOVEN	JOVEN	MADURO	MADURO
	JOVEN %	MARCHITO %	MADURO %	MARCHITO %
Materia seca ¹	19,90	25,90	24,40	33,60
Fibra cruda	23,92	23,98	30,27	28,70
Proteína cruda	16,18	17,43	12,93	14,56
Cenizas	10,37	10,90	8,92	9,11
Extracto no nitrogenado	44,97	43,99	44,45	44,60
Carbohidratos solubles	5,27	5,86	6,27	6,91
Almidón	1,00	0,92	1,09	0,92

¹Sobre material fresco.

ra (Watson y Nash, 1960). Por otro lado el marchitamiento aumentó considerablemente el porcentaje de materia seca del forraje joven y maduro sin alterar mayormente los otros componentes.

Los resultados del Cuadro 1, muestran que se cumplió uno de los objetivos de este ensayo, que fue el de obtener forrajes que tuvieran distinta relación de carbohidratos solubles, proteína cruda y que al momento de ensilar tuvieran alto y bajo contenido de humedad.

B. Composición química del ensilaje.

El Cuadro 2 que muestra los análisis hechos en fresco de los ensilajes, muestra que los contenidos de materia seca conservan la relación del forraje, pero son más bajos que las correspondientes praderas antes de ensilar. Esto es similar a lo encontrado por otros trabajos y se podría atribuir a un fenómeno de compensación, en el que, por una parte, habría evaporación y escurrimiento de agua y, por otra, el proceso de fermentación generaría una gran cantidad de agua y anhídrido carbónico por desdoblamiento de los carbohidratos.

El análisis estadístico señala que el contenido de materia seca es significativamente mayor en los ensilajes maduros y en los marchitos que en los ensilajes jóvenes y no marchitos, respectivamente ($P < 0,01$). La interacción es significativa ($P < 0,01$) indicando

que el grado de marchitamiento impuesto al estado joven fue menor que el del estado maduro.

El contenido de materia seca de los ensilajes está estadísticamente relacionado ($P <$

Cuadro 2 — Composición química de los diferentes ensilajes analizados en fresco (% en base a materia seca).

PARAMETROS	T R A T A M I E N T O S			
	JOVEN	JOVEN MAR- CHITO	MA- DURO	MA- DURO MAR- CHITO
Materia seca (%)	18,88	23,07	22,86	31,66
pH	4,97	4,84	4,87	4,35
Nitrógeno total (%)	2,87	3,16	2,00	2,22
Amoníaco (% N)	0,55	0,33	0,27	0,22
<i>Aminas:</i>				
(mg/100 g materia seca)				
Triptamina	64,62	52,75	0,00	0,00
Tiramina-				
beta-f.e.a	206,42	157,25	52,40	47,80
2-amino-etanol	75,87	81,72	62,87	40,65
Histamina	65,67	44,12	41,30	29,75
Putrescina	39,87	33,25	32,62	23,47
Cadaverina	135,35	73,60	60,80	49,35
Acido acético (%)	3,96	2,56	1,58	2,00
Acido butírico (%)	3,01	3,20	3,39	0,13
Acido láctico (%)	3,90	7,28	6,25	7,42

0,01) con carbohidratos solubles (0,90) del pasto antes de ensilar. En general estas correlaciones están de acuerdo con la literatura citada anteriormente en este trabajo.

Se puede ver que a medida que decrece la materia seca, el pH aumenta. Esto muestra la diferencia que existe con los ensilajes de gramíneas donde se manifiesta el fenómeno inverso (Anderson y Jackson, 1970). La explicación para esta discrepancia puede atribuirse al alto nivel proteico del ensilaje de leguminosas, constituyente que, en estas circunstancias, es una fuente de gran cantidad de compuestos básicos. Es así como un alto contenido de humedad favorece la actividad de las bacterias proteolíticas (Brown y Kerr, 1965) que, a su vez, tienden a aumentar la concentración de compuestos básicos (amoníaco, aminas, bases volátiles, etc.), los que competirán con los compuestos ácidos, y consecuentemente el pH será la resultante de estas variables. En nuestro caso los compuestos ácidos aumentaron en menor proporción que los básicos y por esta razón la cifra de pH aumentó en estos ensilajes.

El pH también estuvo correlacionado ($P < 0,01$) con el contenido de carbohidratos solubles ($-0,72$) del pasto antes de ensilar, confirmando el hecho de que a mayor proporción de carbohidratos, el equilibrio ácido-base se ve desplazado hacia la formación de compuestos ácidos (Voss, 1966).

Otra de las diferencias importantes entre los cuatro ensilajes se atribuye a la fracción nitrogenada.

Se mantiene la relación encontrada en la pradera entre el contenido de nitrógeno total y el estado de madurez. Además, en los ensilajes de pasto marchito el contenido de nitrógeno total es significativamente superior ($P < 0,05$) al de los de pasto no marchito.

La producción de amoníaco de estos ensilajes es muy superior a la cantidad que se produce en los de gramíneas, de acuerdo a algunos trabajos publicados (Voss, 1966), en que el porcentaje de nitrógeno amoniacal del nitrógeno total va desde el 6 al 10%; en cambio en nuestro caso va desde el 10 al 20%, lo que indica la intensa desaminación que ocurre en estos ensilajes de leguminosas.

La formación de amoníaco se vio decrecer significativamente ($P < 0,01$) con el avance de la madurez. Esto se puede deber al bajo contenido de proteína del pasto maduro antes de ensilar.

El amoníaco está significativamente correlacionado ($P < 0,01$) con la razón carbohidratos solubles/proteína cruda ($-0,73$). Esto en parte se debe a que la presencia de carbohidratos fermentables en el medio inhibiría

la formación de enzimas de la desaminación (Barnett, 1954) y, por otra parte, el denominador de esta razón debe ser mayor debido al aumento de proteína cruda que tiende a favorecer una mayor producción de amoníaco. El amoníaco disminuye significativamente ($P < 0,01$) con el aumento de materia seca del ensilaje ($-0,66$), lo que ya ha sido observado por numerosos investigadores.

Los resultados de aminas muestran una tendencia similar al amoníaco y se obtuvieron valores muy altos en este ensayo con respecto a trabajos sobre gramíneas realizados por Neumark *et al.* (1964) y valores relativamente más bajos que los obtenidos por Hughes (1969). La producción de aminas disminuyó significativamente ($P < 0,01$) con el aumento del grado de marchitamiento y con el avance de la madurez. Varios autores (Okamoto *et al.*, 1964) (Voss, 1966) han evidenciado la influencia que ejerce el grado de marchitamiento y el contenido de materia seca del ensilaje sobre la cantidad y formación de algunas aminas, que llega a ser más importante que el contenido de proteína misma.

Las aminas mostraron estar correlacionadas significativamente ($P < 0,01$) con el pH (0,80). La proteólisis seguida por un proceso de decarboxilación va determinando en el medio la aparición masiva de compuestos aminados responsables del alza del pH (Barnett, 1954). Mac Pherson y Violante (1966) observaron que a un pH bajo, la formación de ornitina, putrescina y cadaverina disminuían sustancialmente.

La cantidad de aminas aumenta significativamente ($P < 0,01$) cuando disminuye la razón carbohidratos solubles/proteína cruda del pasto antes de ensilar ($-0,84$). Voss (1966) observó una baja en la cantidad de tiramina al agregar azúcar al material antes de ensilar. También consiguió no superar el límite de 4,2 de pH, nivel en el que la ruptura de aminoácidos se intensifica notablemente. Por otra parte la presencia de carbohidratos en el medio, inhibe la formación de decarboxilasas (Barnett, 1954).

La producción de todas las aminas aumenta significativamente ($P < 0,01$) con la razón proteína cruda/contenido de materia seca del pasto antes de ensilar (0,91). Esto indudablemente muestra que un alto contenido de proteína y humedad favorece la acción de las enzimas propias de la planta y de las que se originan por acción de las bacterias proteolíticas sobre el desdoblamiento de las proteínas y posteriormente de los aminoácidos libres para decarboxilarlos. La triptamina, tiramina, beta-feniletilamina, histamina, putrescina y cadaverina, se forman por la acción específica

de las decarboxilasas bacterianas (Barnett, 1954) sobre sus correspondientes aminoácidos: triptofano, tirosina, fenilalanina, histidina, ornitina y lisina, liberados en la intensa proteólisis que acompaña la fermentación del ensilaje.

Los valores obtenidos de ácidos acético y butírico son bastante más altos que los indicados en otros trabajos (Brown y Kerr, 1965), pero el ácido láctico tuvo valores muy semejantes a esos estudios.

El ácido acético ($P < 0,01$) y el ácido butírico ($P < 0,05$) disminuyeron significativamente con el avance de la madurez; en cambio, el ácido láctico aumentó significativamente ($P < 0,05$).

Al analizar el efecto del marchitamiento, se vio que el ácido butírico disminuyó significativamente ($P < 0,05$) con el marchitamiento, lo que confirma una serie de trabajos publicados (Brown *et al.*, 1965). En cambio, el ácido acético no sufrió variaciones y el ácido láctico aumentó significativamente ($P < 0,01$).

En general la literatura extranjera ha concluido que a medida que aumenta el contenido de materia seca del pasto antes de ensilar, decrece la concentración de cada ácido en el ensilaje. El menor contenido de ácido láctico en el ensilaje de más bajo contenido de materia seca podría deberse al pH más alto, que, a su vez, favorecería la acción de ciertos microorganismos, especialmente del tipo Clostridio (Barnett, 1954) desdoblado el ácido láctico a otros compuestos.

C. Relación entre composición química y consumo.

Este ensayo de consumo se realizó por la posibilidad de que algún compuesto químico analizado en este estudio pudiera explicarlo.

En el ensayo con corderos (Cuadro 3), se aprecia que el consumo de la primera semana tiene una tendencia distinta al de la se-

Cuadro 3 — Promedios de consumo de los cuatro tratamientos experimentales de ensilajes de trébol rosado en ovinos. Consumo expresado en gramos de materia seca por kilogramo de peso metabólico ($Kg.^{0,75}$).

	PRIMERA SEMANA			SEGUNDA SEMANA		
	NO MAR-CHITO	MAR-CHITO	PRO-MEDIO	NO MAR-CHITO	MAR-CHITO	PRO-MEDIO
Joven	58,2	59,9	59,0	54,1	62,9	58,5
Maduro	50,8	62,6	56,7	53,4	64,4	58,9
Promedio	54,5	61,2	—	53,8	63,6*	—

*Significativo al 0,05%.

gunda. Es así como en el consumo de la primera semana, aunque hubo diferencias entre los tratamientos, éstas no fueron significativas; en cambio, en la segunda semana, al ampliarse las diferencias, resultaron significativamente mayores ($P < 0,05$) en los ensilajes cuyo pasto había sufrido marchitamiento.

Al graficar los diferentes consumos de esta segunda semana con las variables individuales se observó que los mayores consumos tienden a estar relacionados con los ensilajes que tienen mayor cantidad de ácido láctico. La Figura 1 muestra que dentro de cierto rango, a una mayor concentración de ácido láctico, mayor es el consumo. Como en algunos trabajos se ha determinado que los ácidos derivados de la fermentación del ensilaje no tienen influencia en el consumo (Thomas *et al.*, 1961), se podría pensar que el ácido láctico es un índice de buena fermentación más que de mayor consumo.

El análisis hecho entre cada una de las otras variables con esta segunda semana de consumo, no mostró relaciones, lo que induce a pensar que: 1) individualmente no llegaron a concentraciones que pudieran determinarlo; 2) que una asociación de dos o más de ellas actúan en forma simultánea, lo que no se pudo medir en este ensayo; 3) que son otros los compuestos que pueden afectar el consumo; 4) que la corta duración del ensayo

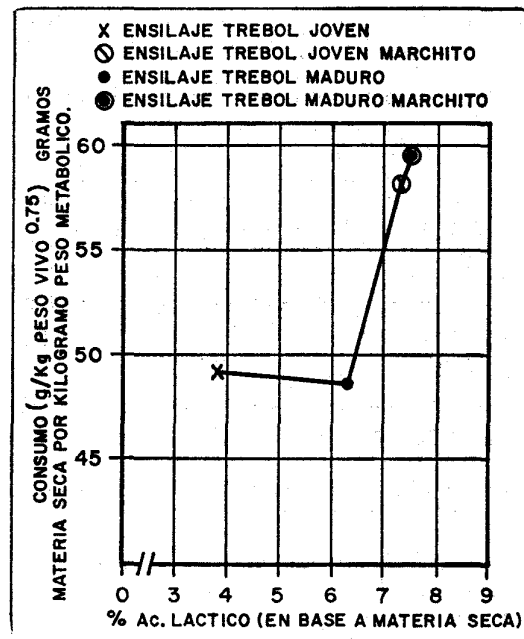


Figura 1 — Consumo segunda semana en ovinos vs. concentración ácido láctico de los diferentes tratamientos de ensilaje de trébol rosado.

no alcanzó a destacar en forma clara la variable causante de esta diferencia.

El hecho de existir diferencias significativas entre algunos consumos de corderos, indica la necesidad de que en futuros trabajos se analicen otros componentes del ensilaje, como por ejemplo, aldehídos, aminas, etc.

En cuanto a novillos, en la primera semana hubo un consumo significativamente mayor ($P < 0,05$) de los ensilajes jóvenes que de los maduros (Cuadro 4). Al realizar un estudio de correlación, este consumo gráficamente tendió a estar relacionado positivamente con el contenido de nitrógeno total y de ácido acético del ensilaje. En la segunda semana ambos estados de madurez bajaron su consumo a igual nivel, lo que puede estar indicando que alguno o varios compuestos

Cuadro 4 — Promedios de consumos de los cuatro tratamientos experimentales de ensilajes de trébol rosado en vacunos. Consumos expresados en gramos de materia seca por kilogramo de peso metabólico. (Kg.^{0,75}).

	PRIMERA SEMANA			SEGUNDA SEMANA		
	NO MAR- CHITO	MAR- CHITO	PRO- MEDIO	NO MAR- CHITO	MAR- CHITO	PRO- MEDIO
Joven	77,8	76,7	77,3*	68,2	67,6	67,9
Maduro	70,0	72,8	71,4	64,9	67,8	66,4
Promedio	73,9	74,9	—	66,6	67,7	—

*Significativo al 0,05%.

empezaron a actuar sobre los animales y, especialmente, sobre el grupo que consumía ensilaje joven.

RESUMEN

Se realizó un estudio de algunos compuestos químicos originados durante el proceso de la fermentación de ensilajes de trébol rosado (*Trifolium pratense* L.), con distintos estados de madurez y grado de marchitamiento, con el fin de obtener un producto con diferentes características, de los cuales las más importantes son: proteínas, carbohidratos solubles y humedad.

En este trabajo se distinguen cuatro tipos de ensilajes: joven, joven marchito, maduro y maduro marchito con 19,9 - 24,5 - 25,9 y 33,6% de materia seca, respectivamente.

Se observó que el pH, el contenido de amoníaco, aminas y ácidos orgánicos están estrechamente relacionados con el grado de marchitamiento y el avance de la madurez del pasto antes de ensilar. La intensa formación de aminas se podría predecir con la determinación de las razones: carbohidratos solubles/proteína cruda y proteína cruda/contenido de materia seca del pasto antes de ensilar.

Los diferentes rangos de concentración de aminas y los distintos niveles de pH y materia seca del ensilaje no afectaron significativamente el consumo en vacunos ni en ovinos, en este ensayo.

SUMMARY

The study of some chemical compounds originated in the process of fermentation of four types of silage of red clover (*Trifolium pratense* L.), was conducted. These silages were made from clover clipped at two stages of maturity and two degrees of wiltiness to obtain different percent of protein, soluble carbohydrates and dry matter content.

Dry matter percent of the four treatments were 19.9 - 24.4 - 25.9 - 33.6 per cent, respectively; qualitative and quantitative differences of the various compounds analyzed were determined and correlated with amount of silage consumed when fed to cattle and sheep.

The results indicated that pH, ammonium content, amines and organic acids in the silage were closely related with degree of wiltiness and degree of maturity of the clover at the time the silage was made. The amount of amines formed could be predicted depending upon the ratios: soluble carbohydrate/crude protein and crude protein/dry matter content of the legume at the time of making the silage.

The different amine concentrations, pH levels and dry matter content of the silage did not significantly affect consumption by cattle or sheep.

LITERATURA CITADA

- ANDERSON, B. K. and JACKSON, N. 1970. Conservation of herbage of varying dry matter content in air-tight metal containers with reference to the carbohydrate fraction. *J. Sci. Fd. Agric.* 21: 228-233.
- A.O.A.C. 1964. Official methods of analysis of the association of official agricultural chemists. 9na. ed. George Banta Company Inc. Menasha, Wisconsin, 283.
- BARNETT, A. J. 1954. Silage fermentation. Ira. ed. Academic Press. New York.
- BROWN, W. O. and KERR, J. A. 1965. Losses in the conservation of heavily wilted herbage sealed in polythene film in lined trench silos. *J. Br. Grassld Soc.* 20: 227.
- CASTILLO, D. 1970. Estudio de compuestos químicos que pueden afectar el consumo de ensilaje de trébol rosado en vacunos y ovinos. Santiago. Universidad de Chile, 40 p. (Tesis Quím. Farm., mimeografiada).
- DEVILAT, J. 1967. Valoración con novillos de los ensilajes de alfalfa y trébol rosado con y sin marchitamiento. *Agricultura Técnica (Chile)* 27: 21-28.
- HAWKINS, D. R., HENDERSON, H. E. and PURSER, D. B. 1970. Effect of dry matter levels of alfalfa silage on intake and metabolism in the ruminant. *J. of Animal Sci.* 31: 617.
- HUGHES, A. D. 1969. The non protein nitrogen composition of grass silage. 1. The estimation of the basic amino acids and non-volatile amines by chromatography on a weak cation exchange resin. *J. Agric. Sci. Camb.* 72: 459.
- JACKSON, R. B. 1964. Volatile bases in ryegrass silage. *J. Sci. Fd. Agric.* 15: 308.
- KIRCHGESSNER, M. y HIRSCH, P. 1964. Aspectos fisiológicos de la producción de carne y leche con una alimentación de ensilaje. *Nutr. Bromatol. Toxicol.* 3: 1.
- LEPPER, H. 1951. Determinación de ácido acético, butírico y láctico. *Handbuch der Landwirtschaftlichen Versuch-und Untersuchungs Methodik Rudolf Herrmann Verlag.* Berlin.
- MAC PHERSON, H. T. and VIOLANTE, P. 1966. Ornithine, putrescine and cadaverine in farm silage. *J. Sci. Fd. Agric.* 17: 124.
- NELSON, N. A. 1944. Photometric adaptations of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153.
- NEUMARK, H., BONDI, A. and VOLCANI, R. 1964. Amines, aldehydes and keto acids in silages and their effect on food intake by ruminants. *J. Sci. Fd. Agric.* 15: 487.
- OKAMOTO, M., WALDO, D. R., MILLER, R. W. and MOORE, L. A. 1964. Histamine levels in forage and dry matter intake of heifers. *J. Dairy Sci.* 47: 1231.
- RUIZ, I. y CARRILLO, R. 1965. Ensayo comparativo sobre la producción de leche obtenida con ensilajes de maíz Eureka y trébol rosado. *Investigaciones ganaderas de Chile.* 1: 91.
- SMITH, D. 1969. Removing and analyzing total nonstructural carbohydrates from plant tissue. Research Division College of Agricultural and Life Science. University of Wisconsin. Research Report Nº 41: 3.
- THOMAS, J., MOORE, L., OKAMOTO, M. and SYKES, J. 1961. A study of factors affecting rate of intake of heifers fed silage. *J. Dairy Sci.* 44: 1471.
- TRUTER, E. V. 1963. Thin film chromatography. Ira. ed. Cleaver Hume Press Ltd. London. 130 p.
- VOSS, N. 1966. Amines and ammonia as products of protein decomposition in silages. Proceeding of the X International Grassland Congress Finland. Section 2, paper 45: 540.
- WATSON, S. J. and NASH, M. 1960. The conservation of grass and forage crops. 2da. ed. Oliver and Boyd Edinburgh and London.
- WERNLI, C. y ROMERO, J. 1967. Consumo y valor nutritivo de los ensilajes de alfalfa y trébol rosado ensilados con distinto contenido de humedad para novillos de engorda. 3ª Reunión Producción Animal. Publicación Especial 5: 56.
- YOSHINAGA, K., ITOH, C., ISHIDA, N., SATO, K. and WADA, Y. 1961. Quantitative determination of metadrenaline and normetadrenaline in normal human urine. *Nature* 191: 599.