

INFLUÊNCIA DO JEJUM SOBRE O RESTABELECIMENTO DA ATIVIDADE MICROBIANA RUMINAL EM BOVINOS FISTULADOS

Felipe Tramontim Mainardes¹, Sergio Hoeldtke Junior¹, Barbara Haline Buss Baiak¹, Letícia Tozetto¹, Felipe Preto Grzebielucka¹, Diego Schackeler Martins¹, Leandro Cavalcante Lipinski², José Luiz Moletta³

¹ Graduando em Zootecnia – Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG/PR.

² Prof. do Depto de Zootecnia da Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG/PR.

³ Pesquisador do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR, Ponta Grossa – PR.

RESUMO

As condições de restrição alimentar ou anorexia podem alterar o perfil metabólico ruminal de bovinos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as alterações fisiológicas em bovinos fistulados submetidos a jejum de até 62 horas. Foram utilizados 5 bovinos machos, com idade de 3 anos, sendo coletadas amostras de 500 ml de suco ruminal nos períodos de 2, 4, 8, 14, 26, 38, 50 e 62 após a alimentação, durante o jejum e a realimentação. Após o jejum os animais foram alimentados normalmente, sendo feitas coletas até o período de restituição da microbiota normal do rúmen. As avaliações realizadas foram: pH, contagem de protozoários, redução do azul de metileno e glicemia. No período de jejum houve uma moderada hipoglicemia (nas primeiras horas), queda na quantidade de protozoários, aumento do tempo de redução do azul de metileno e o pH foi aumentado. A realimentação causou rápida recuperação do funcionamento ruminal, com exceção da contagem dos protozoários que ficou abaixo do normal. A restrição alimentar de até 62 horas em bovinos causou alterações ruminais que levaram 74 horas para o restabelecimento dos parâmetros.

Palavras – chave: Anorexia, bovinos fistulados, fisiologia, jejum, microbiota ruminal.

ABSTRACT

INFLUENCE OF FASTING ON THE RESTORATION OF RUMEN MICROBIAL ACTIVITY IN BOVINE RUMINAL FISTULATED

The conditions of food restriction or anorexia may change the metabolic profile of bovine rumen. This study aimed to assess the physiological changes in cattle fistulated fasted for up to 62 hours. 5 steers were used, aged 3 years and collected samples of 500 ml of ruminal fluid during periods of 2, 4, 8, 14, 26, 38, 50 and 62 after feeding, during fasting and refeeding. After fasting the animals were fed normally, collections being until the period of restoration of normal microbiota of the rumen. The evaluations were: pH, protozoal counts, reduction of methylene blue and glucose. During fasting there was a moderate hypoglycemia (within hours), fall in the number of protozoa, prolonged reduction of methylene blue and the pH was increased. The feedback caused rapid recovery of rumen function, except for the counting of protozoa was below normal. Dietary restriction of up to 62 hours in cattle rumen caused changes that led to 74 hours to restore the parameters.

Keywords: Anorexia, Fasting, Fistulated cattle, Physiology, Rumen microbial activity.

1. INTRODUÇÃO

A anorexia é um sintoma de origem complexa que causa a ausência de apetite, diminuindo assim a ingestão de alimentos, interferindo no perfil de funcionamento do rúmen, podendo mudar totalmente fatores de extrema importância na digestão (pH, quantidade de bactérias e protozoários). Pode ser causada em bovinos por diversas formas, podendo ser por febre, dor, toxemia, intoxicação, traumas, inflamações, enfermidades nutricionais, doenças, entre outros fatores (RODOSTITS et al., 2000). Helminhos também podem estar prejudicando o animal, não só em termos de perda de peso, mas também pela paralisação do crescimento e morte da microbiota ruminal (BARGER, 1982). As infecções causadas por parasitas interferem no consumo de alimento do animal, conforme o grau de severidade da infestação do rebanho (ARMOUR, J (1980) e ENTROCASSO et al. (1986)).

Outro fator que pode interferir e causar a anorexia no gado é a intoxicação por plantas, tais como: *Baccharidastrium triplinervium* (Asteraceae) conforme (LANGOHR et al., 2005); *Echinochloa polystachya* (capim-mandante) e *Pennisetum purpureum* (capim-elefante) conforme (MEDEIRO et al., 2003).

Para a avaliação ruminal podem ser utilizados animais fistulados, facilitando assim, o acesso ao rúmen, e utilizar técnicas de avaliação do fluido ruminal para a avaliação do metabolismo ruminal (ROSEMBERGER, 1983).

O rúmen é o pré-estômago dos ruminantes. É onde acontece a digestão fermentativa em conjunto com o retículo. Os microorganismos contidos no rúmen e no retículo fazem a degradação de paredes celulares e fibras (celulose e hemicelulose), que são materiais invulneráveis à atuação de enzimas dos mamíferos, ocorrendo assim o processo de fermentação microbiana, para que haja o aproveitamento destas (DYCE, 2004).

Dentro da massa fermentativa dos ruminantes temos vários tipos de microorganismos, como bactérias, fungos e protozoários. A maioria desses microorganismos é anaeróbios estritos, por isso há interferência por parte da fístula utilizada para a avaliação.

A colheita de suco ruminal para avaliação pode ser feita por sonda esofagiana ou por fístula ruminal. Neste experimento utilizamos a fístula ruminal para a colheita. Tal processo exige intervenção cirúrgica para colocação da cânula, o que aumenta os custos do experimento e os cuidados para que os animais não tenham problemas de saúde, limitando assim o número de animais utilizados.

O método de colheita por sonda esofagiana viabiliza quantidades maiores de animais para este tipo de experimento, porém o conteúdo ruminal pode ser contaminado com saliva, elevando o pH, e havendo comprometimento das análises, gerando assim, dados irreais (RAUN & BURROUGHS, 1962; ORTOLANI, 1981).

Para que sejam preservadas as condições ruminais, as coletas e as análises do fluído devem ser realizadas rapidamente, exigindo a retirada do conteúdo ruminal de forma criteriosa e rápida. Essa eficiência na coleta diminui os efeitos externos sobre parâmetros como pH, temperatura, bem como a questão microbiológica, onde afeta a quantidade de protozoários presentes no fluído ruminal (RAUN & BURROUGHS, 1962; LANE et al., 1966; ORTOLANI, 1981; LAVEZZO et al., 1988).

OBJETIVO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar o tempo de recomposição da atividade microbiana ruminal, acompanhando os valores de glicose, pH, tempo de redução do azul de metileno, contagem de protozoários, em bovinos fistulados submetidos a jejum e depois realimentados, demonstrando assim o resultado de um manejo de criadores e expositores de bovinos que submetem esses animais a varias horas de jejum, tanto na compra, na venda, ou até mesmo em animais levados em exposições.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), na Estação Experimental Fazenda Modelo, situada na cidade de Ponta Grossa – PR, no período de 15 a 25 de outubro de 2011.

Foram utilizados 5 bovinos fistulados da raça Purunã, machos inteiros com 3 anos de idade, tendo sido fistulados com 1 ano de idade, confinados em baias individuais. Os animais foram alimentados com silagem e ração, fornecendo 2,2% do peso vivo em matéria seca, cujo fornecimento ocorria duas vezes ao dia, uma às 9:00 e outra às 17:00.

Os animais foram submetidos a jejum de 62 horas, coletando 500 ml de suco ruminal durante o período de jejum e realimentação. As técnicas utilizadas para a avaliação do suco ruminal foram as sugeridas por ROSEMBERGER (1983), sendo, o pH do suco ruminal, redução do azul de metileno e contagem de protozoários. As análises do conteúdo ruminal foram realizadas imediatamente após a coleta, pois a microbiota ruminal não sobrevive em aerobiose por tempo prolongado, podendo haver alterações na atividade dos protozoários e mudanças no pH. A coleta deve ser eficiente, criteriosa e rápida para que não haja problemas de modificações nesses parâmetros (RAUN & BURROUGHS, 1962; LANE et al., 1966; ORTOLANI, 1981; LAVEZZO et al., 1988).

Em todas as coletas eram executados todos esses testes laboratoriais, sendo que no jejum foram realizadas avaliações 2, 4, 8, 14, 26, 38, 50 e 62 horas após a última alimentação. Realimentando os animais normalmente foram feitas as coletas 2, 4, 8, 14, 26, 38, 50, 62 e 74 horas após a alimentação, observando o retorno dos parâmetros normais fisiológicos do rúmen.

O pH ruminal foi realizado instantaneamente no momento da coleta onde utilizamos um medidor de pH modelo INSTRUTHERM pH-1500, calibrado em soluções conhecidas.

Para a técnica de Tempo de Redução do Azul de Metileno (TRAM), misturou-se 1 ml da solução de azul de metileno a 0,3% em 20 ml de suco ruminal, utilizando tubo de ensaio. As comparações foram realizadas constantemente utilizando outro tubo contendo apenas suco ruminal, sendo o testemunho para a paralisação do tempo o momento em que as duas amostras iguaissem as suas cores. Foram realizadas as cronometragens do tempo de descoloração a partir da adição do reagente (ROSEMBERGER, 1983).

O princípio do teste é avaliar o tempo que as bactérias redutoras presentes no fluído, onde se adicionou a solução de Azul de Metileno a 0,3%, levam para retornar à cor inicial (ROSEMBERGER, 1983).

As contagens de protozoários foram feitas através de uma gota de suco ruminal filtrado em gaze, inserida em uma lâmina aquecida a 30°C e analisada em microscópio óptico com a lente objetiva de aumento de 10 vezes, classificando-as em: 0 (nenhuma), + (pouca), ++ (moderada), +++ (abundante) quantidade de protozoários no suco ruminal, conforme a densidade populacional de protozoários e a sua movimentação (GONZÁLEZ et al., 2000).

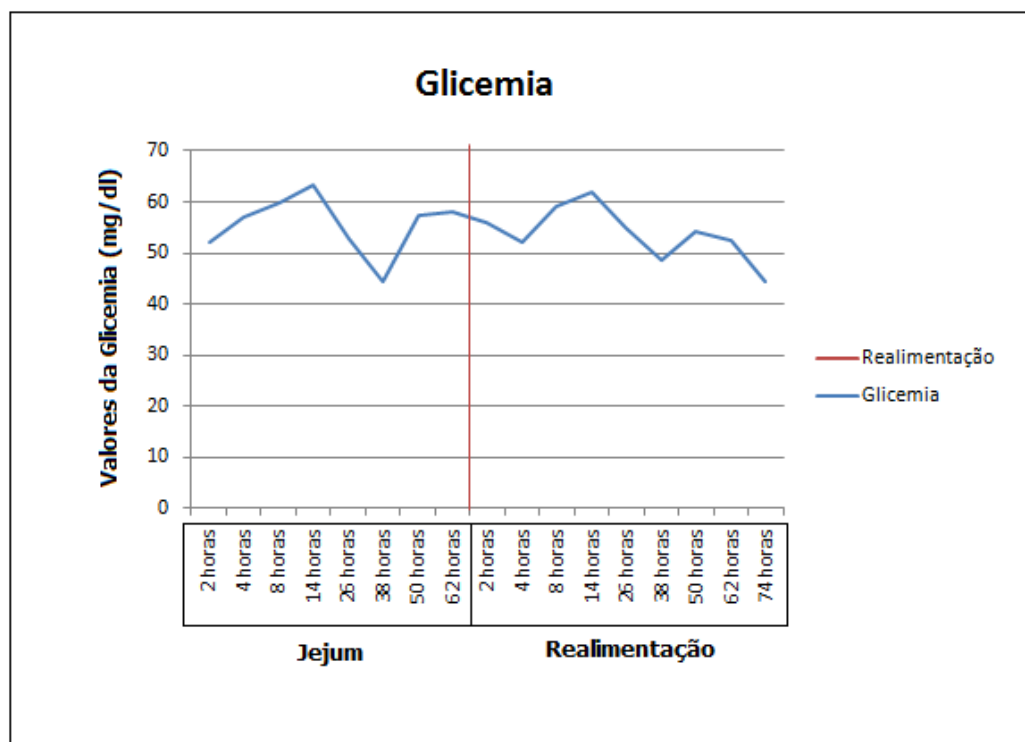
A mensuração da glicemia foi aferida antes da coleta do conteúdo ruminal, sendo feita através de glucômetro portátil (modelo: Bayer *breeze 2*), coletando apenas uma gota de sangue da cauda do animal, e colocando-a em cima da fita de medição do aparelho.

Os resultados foram avaliados através de métodos estatísticos de Análise de Variância e Teste de Tukey a 5%, para a comparação das médias, sendo um delineamento de blocos casualizados (DBC) com 2 Tratamentos (jejum e realimentação) e 5 Repetições (5 animais), através do software PASW – statistics 18.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Durante as primeiras horas do período de jejum o parâmetro glicose teve uma decaída, das 26 às 38 horas de jejum, tendo uma retomada logo após. Com o déficit energético, há menor formação de glicose pelo corpo, causando uma hipoglicemia no animal (BOUCHAT et al., 1981). Embora os ruminantes não utilizem a glicose como combustível universal para todas as células, este substrato é fundamental para manutenção energética das células nervosas, da musculatura, dos tecidos fetais, da glândula mamária e para os eritrócitos (LENG, 1962), por isso foi realizada sua medição.

Conforme o resultado estatístico, não houve diferença significativa nos períodos de avaliação do experimento ($p > 0,05$). Houve uma diminuição da glicemia nos períodos de 26 e 38 horas após a última alimentação, contudo a glicemia estava próxima ao intervalo considerado normal, que seria de 45 mg/dl a 75 mg/dl, estando com média de 44,6 mg/dl.



- **Figura 1:** Curva glicêmica durante o período de jejum e de realimentação.

Após a hipoglicemia moderada decorrente do jejum ocorrido nos animais (Figura 1), teve-se um aumento considerável de glicemia, de 44,6 mg/dl às 38 horas, para 58,2 mg/dl no momento 50 horas, correspondente a 28%. Os ruminantes têm a capacidade de adaptação a períodos de subnutrição, ou de restrição alimentar, pois conseguem mobilizar com presteza substratos de suas reservas corporais para suprir o déficit energético, utilizando primeiramente reservas de glicogênio hepático e posteriormente da musculatura estriada (OETZEL, 1988; HERDT, 2000). Outro fator seria a capacidade de diminuir a taxa de metabolismo basal, diminuindo a concentração de hormônios da tireóide (CHILLIARD et al., 1998).

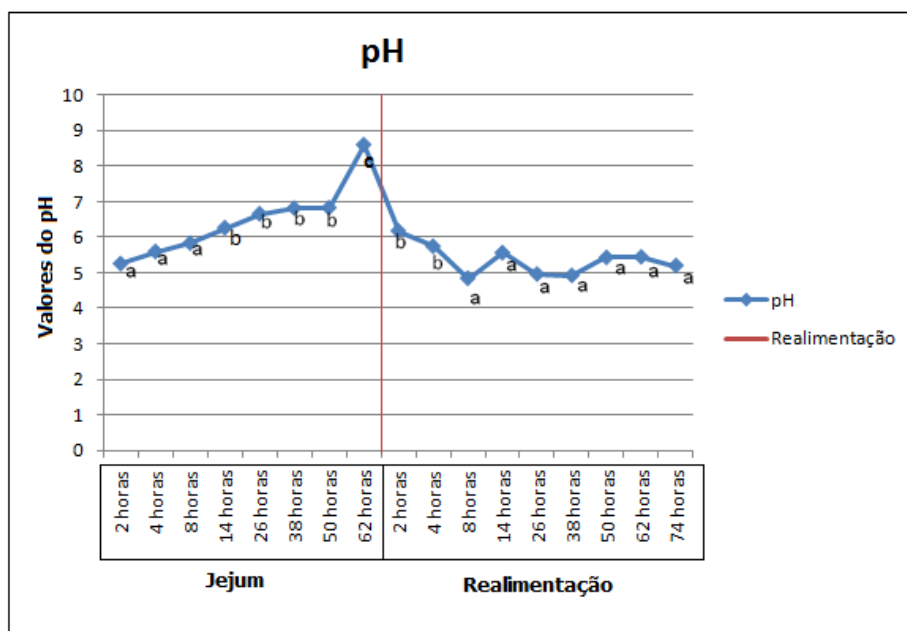
Após as primeiras horas de privação alimentar o organismo começa a executar proteólise nas reservas de energias nas proteínas da musculatura esquelética, ocorrendo um catabolismo protéico, que deve ser mantido pela diminuição de concentração plasmática de insulina, aumentando a secreção de glicocorticóides (OETZEL, 1988). Os glicocorticóides são de extrema importância para vários órgãos e sistemas, participando da regulação fisiológica e da adaptação às situações de estresse (CUNNINGHAM, 2004), podendo assim ter sido outro motivo para o acréscimo brusco de glicemia, o manejo estressante do jejum.

Uma das medições mais conhecidas em relação a avaliação clínica do rúmen é o pH (ORTOLANI, 1981). Este varia não só por condições adversas como a anorexia, mas também pela composição dos alimentos ingeridos, quantidade de alimento, tempo de passagem, quantidade de saliva secretada e absorção de ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen (ROSEMBERGER, 1983). Em relação a composição do alimento, quanto mais carboidratos contiver o alimento, maior será a produção de ácidos, e quanto maior for a quantidade de fibra, maior a secreção de saliva, que alcaliniza e tampona o bolo alimentar.

Outros estudos mostram que o jejum causa um incremento no pH ruminal, devido à menor fermentação ruminal, pois o animal continua absorvendo ácidos produzidos anteriormente, assim com a secreção pequena e prolongada de saliva, alcalinizando o rúmen (BARTLEY, 1976).

O pH ruminal deve estar perto da neutralidade para que esteja em condições normais, próximo de 6,2, para que bactérias celulolíticas primárias (degradam a fibra) e a maior parte das secundárias (usam como seu substrato os produtos finais da degradação feita pelas bactérias primárias, incluindo nesse grupo propionobactérias que utilizam o lactato e produzem propionato; e as bactérias metanogênicas que utilizam hidrogênio e produzem gás metano) estejam ativadas e em pleno funcionamento durante a digestão. Já as bactérias primárias amilolíticas são ativadas em condições ácidas, com pH em torno de 5,8 (SWENSON, M.J., 1984).

Durante o período de jejum houve um aumento do pH, das 2 às 62 horas de jejum, crescendo 3,34 pontos do começo ao fim do jejum. No início os animais estavam na média de 5,24, e ao término do jejum com pH de 8,59. Ao retomar a alimentação os animais tiveram imediata diminuição do pH, chegando a um pH médio de 6,17 (Figura 2).



- **Figura 2:** Valores da Medição do pH durante o período de Jejum e Realimentação.

Às 62 horas de jejum os animais apresentaram o pH mais alto do experimento (Tabela 1), sendo alcalino, devido a menor produção de ácidos graxos voláteis e secreção de saliva. A saliva tem pH 8,1, aproximadamente, pois é rica em bicarbonato, e 36% da secreção de saliva ocorre no período de descanso, ou seja, quando o animal não está se alimentando e nem ruminando (BARTLEY, 1976).

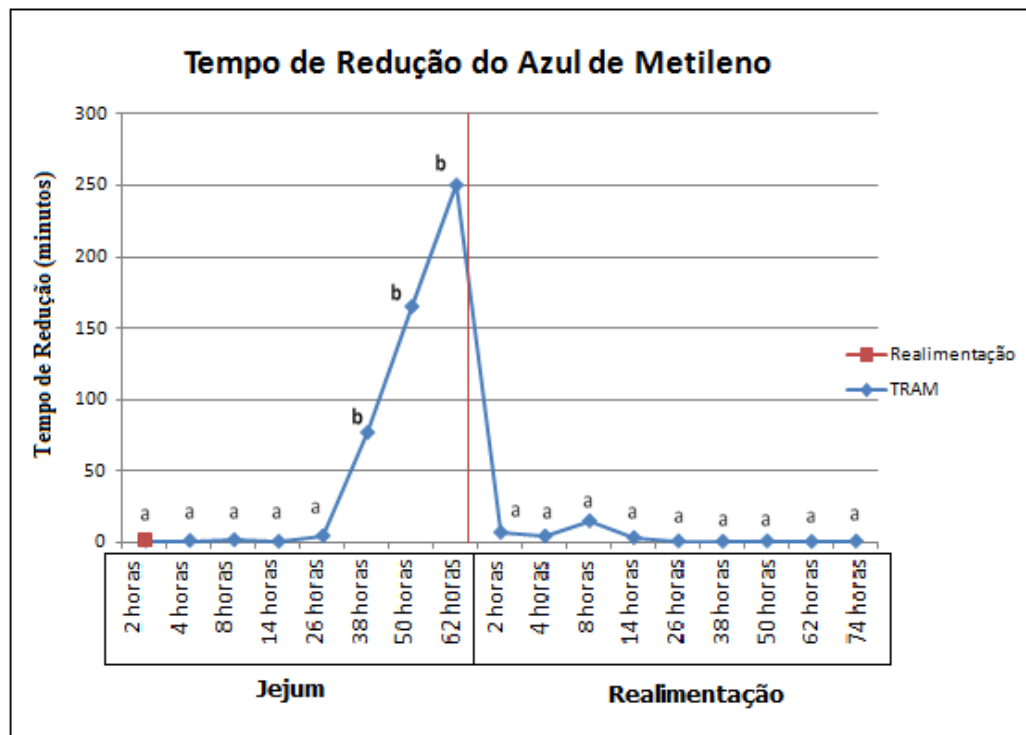
- **Tabela 1:** Médias de pH nos tempos de Jejum e Realimentação.

Tempos	Médias - pH
2 horas	5,24 a
4 horas	5,58 a
8 horas	5,88 a
14 horas	6,25 b
26 horas	6,65 b
38 horas	6,81 b
50 horas	6,82 b
62 horas	8,59 c
Realimentação	
2 horas	6,17 b
4 horas	5,73 b
8 horas	4,83 a
14 horas	5,56 a
26 horas	4,95 a
38 horas	4,92 a
50 horas	5,42 a
62 horas	5,44 a
74 horas	5,19 a

Às 8 horas de jejum o valor do pH foi significativamente maior que o momento inicial ($p < 0,05$), tendo um acréscimo de: 1,008 às 14 horas de jejum; 1,402 às 26 horas; 1,56 às 38 horas; e 1,572 às 50 horas. Os valores do pH somente foram iguais aos iniciais após a alimentação.

Depois de realizada a alimentação o pH reduz gradativamente, diminuindo 2,42 após 2 horas de realimentação, e 2,85 após 4 horas de realimentação (Tabela 1).

Em relação a atividade microbiana houve uma alteração no perfil ruminal, em virtude da súbita interrupção do fornecimento de alimento. Um dos métodos utilizados que provou a significativa diminuição de bactérias foi o Tempo de Redução de Azul de Metileno (TRAM), que quanto maior o tempo para redução, menor a quantidade de bactérias, cujo inverso também é verdadeiro.



- **Figura 3:** Linha do Tempo (m) de Redução do Azul de Metileno durante o período de Jejum e Realimentação.

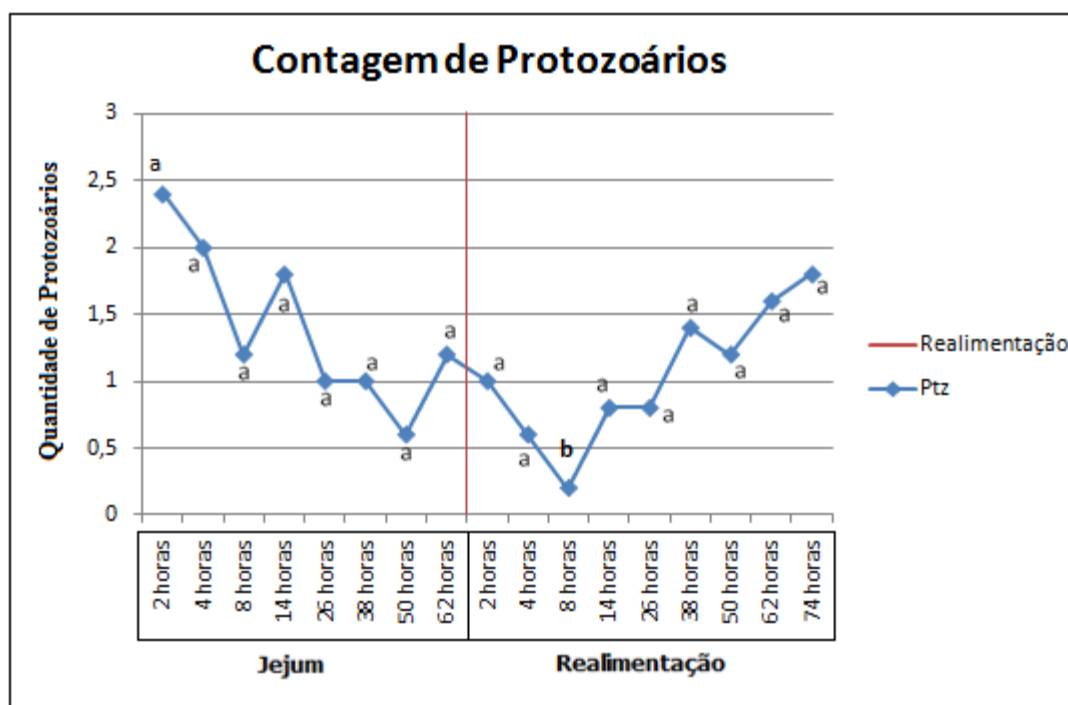
Quanto maior o tempo de Jejum, maior o TRAM, demonstrando que as bactérias estavam se extinguindo dentro do rúmen do animal, sendo que o tempo normal para a redução seria de 3 a 6 minutos. Das 2 às 38 horas de jejum o tempo de redução aumentou mais de 90 vezes, e ao período de 62 horas de jejum não houve mais redução, demonstrando que a quantidade de bactérias contidas no rúmen era mínima.

Com a extinção de alimento dentro do rúmen, aumenta a quantidade de oxigênio, matando as bactérias ali presentes, pois são bactérias anaeróbias. Outro fator seria a toxidez do fluido ruminal – quando há a junção com o oxigênio (VAN SOEST, 1982), diminuindo a atividade microbiana ruminal.

Os protozoários transformam os alimentos através da fermentação em ácidos orgânicos, CO₂ e hidrogênio, melhorando o aproveitamento dos alimentos ingeridos pelo animal, tornando-o mais eficiente. Uma função potencialmente importante dos protozoários envolve a sua capacidade de retardar a digestão de substratos rapidamente fermentáveis, como amido e algumas proteínas (CUNNINGHAM, 2004).

Os protozoários ciliados são metabolicamente versáteis e capazes de usar todos os principais constituintes dos vegetais. Já os protozoários entodiniomorfo englobam partículas de materiais, tendo também enzimas que atacam a celulose e a hemicelulose. Enquanto os holotríquios geralmente dependem de um polissacarídeo não-estrutural, especialmente amido e açúcares solúveis (SWENSON, M. J., 1984).

A menor ingestão ou a interrupção do consumo de alimentos interfere negativamente no perfil ruminal, especialmente nas avaliações de atividade e funcionamento da população microbiana. Durante o jejum há queda tanto de bactérias quanto de protozoários, principalmente os redutores, em razão do aumento de oxigênio dentro do rúmen, uma vez que são anaeróbios.



- **Figura 4:** Curva da contagem de protozoários durante o Jejum e Realimentação.

Como explorado no gráfico (figura 4), a quantidade de protozoários cai bruscamente das 2 às 8 horas de jejum, diminuindo 50% da quantidade de protozoários. Das 8 às 50 horas de jejum temos decréscimo de 50% novamente. E das 50 horas de jejum às 8 horas da realimentação há um novo decréscimo de 33,33%, ficando mínima a quantidade de protozoários, em média 0,2.

Apenas às 8 horas de realimentação houve diferença significativa em relação às 2 horas de jejum ($p < 0,05$), pela diminuição excessiva dos protozoários. Após a realimentação houve lenta recuperação da microbiota ruminal, devido a fermentação estar abaixo do padrão normal, não havendo ambiente favorável para a proliferação de protozoários, diminuindo ainda até ocorre-se fermentação ideal.

Às 8 horas da realimentação, além de ser o momento com a menor contagem de protozoários, foi o menor índice de pH, estando em 4,84. Até que houvesse o aumento do pH

ruminal, permanecia estagnado o aumento de protozoários. Já as 50 horas após a realimentação, onde o pH aumentou 12% (indo de 4,84 para 5,42), a quantidade de protozoários foi ampliada em 6 vezes.

Quando retomamos a alimentação, ocorreu excesso de produção de AGV's, diminuindo o pH. Conseqüentemente diminuindo instantaneamente a quantidade de protozoários e bactérias, até que seja restabelecidos parâmetros ideais de pH, com a regulação de AGV e secreção de saliva, fornecendo um ambiente favorável para crescimento e desenvolvimento da população microbiana.

4. CONCLUSÃO

O jejum afeta o perfil fisiológico do rúmen, tendo havido aumento do pH, diminuição da quantidade de bactérias, leve hipoglicemia nas primeiras horas de jejum e uma redução drástica de protozoários com difícil restabelecimento após a realimentação. A recuperação de animais submetidos a períodos de jejum prolongados é lenta e gradativa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMOUR, J. The Epidemiology of Helminth Disease in Farm Animals. *Veterinary Parasitology* v.6, n.1-3, p.7-46, 1980.

BARGER, J.A. Helminth Parasites and Animal Production. In: SYMONS, L.E.A.; DONALD, A.D.; DINEEN, J.K. *Biology and Control of Endoparasites*. Sidney: Academic Press, 1982. p.133-155. McMaster Laboratory 50th Anniversary Symposium in parasitology, 1981, Sydney.

BARTLEY, E. E. *Buffers in ruminant physiology and metabolism*. New York: Church Dwight Co., 1976.

BOUCHAT, J. C.; DOIZE, F.; PAQUAY, R. Influence of diet and prolonged fasting on blood lipids, ketone bodies, glucose and insulin in adult sheep. *Reproduction Nutrition Development*, v. 21, n. 1, 1981.

CHILLIARD, Y.; BOCQUIER, F.; DOREALL, M. Digestive and metabolic adaptation of ruminants to undernutrition and consequences on reproduction. *Reproductive Nutrition Development*. V. 38, n. 2, 1998.

CUNNINGHAM, J. G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1993.

DYCE, K. M.; SACK, M.O.; WENSING, C.J.G.; *Tratado de Anatomia Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

ENTROCASSO, C.M.; PARKINS, J.J.; ARMOUR, J. Production, Parasitological and Carcass Evaluation Studies in Steers Exposed to Trichostrongile Infection and Treated with a Morantel Bolus or Fenbendazole in Two Consecutive Grazing Seasons. *Research in Veterinary Science*, v.4, p.76-85, 1986.

GONZÁLEZ, F. H. D., Perfil Metabólico em Ruminantes: Seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p. 63 – 74.

HERDT, H. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. The Veterinary Clinics of North America: food animal practice, v. 16, n.2, 2000.

LANE, G.T.; CUMMINGS, K.R.; NOLLER, C.H.; COLENBRANDER, V.F. A Continuous Flow Device for Obtaining Ruminoreticular pH Values and Fluid Samples. Journal of Animal Science, Champaign, v.25, n.3, 1966.

LANGOHR, I. M.; GAVA, A.; BARROS, C. S. L. Intoxicação por Baccharidastrium triplinervium (Asteraceae) em bovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira.

LAVEZZO, O.E.N.M.; FARIA, V.P.; MATTOS, W.R.S.; LAVEZZO, W. Influência de Métodos de Coleta de Fluido Ruminal sobre os Parâmetros de Fermentação em Bovinos Alimentados com Diferentes Fontes de Proteína. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa, v.17, n.3, 1988.

LENG, R. A.; ANNISON, E. F.; Metabolic Activities of Sheep Erythrocytes. Australian Journal Agriculture Research, v. 13, n.1, 1962.

MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F.; TABOSA, I. M.; SILVA, Z. A.; BARBOSA, R. C.; MARQUES, A. V.; NOGUEIRA, F. R. B. Intoxicação por nitratos e nitritos em bovinos por ingestão de Echinochloa polystachya (capim-mandante) e Pennisetum purpureum (capim-elefante) no sertão da Paraíba. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2003

OETZEL, G. R.; OLSON, J. D.; CURTIS, C. R. Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. Journal Dairy Science, v.71, n. 7, 1988.

ORTOLANI, E.L. Considerações Técnicas Sobre o uso da Sonda Esofágica na Colheita do Suco de Rúmen de Bovinos para Mensuração do pH. Arquivos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, v.33, n.2, 1981.

RAUN, N.S. ; BURROUGHS, W. Suction Strainer Technique in Obtaining Rumen Fluid Samples From Intact Lambs. Journal of Animal Science, Champaign, v.21, n.3, 1962.

ROSEMBERGER, G. Exame Clínico de Bovinos. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1983.

SWENSON, M. J. – Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos – 10ª Ed Editora Guanabara S.A., Rio de Janeiro, 1984.

VAN SOEST, P. J. Nutrition Ecology of Ruminants, Ithaca: Comstock Publishing Associates, 1982.