

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITO DAS FREQUÊNCIAS DE ALIMENTAÇÃO SOBRE O
DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA E SAÚDE RUMINAL DE
BOVINOS NELORE CONFINADOS**

TÁSSIA VELUMA BARBOSA CARRARA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do Título de
Mestre.

BOTUCATU – SP

FEVEREIRO/2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**EFEITO DAS FREQUÊNCIAS DE ALIMENTAÇÃO SOBRE O
DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA E SAÚDE RUMINAL DE
BOVINOS NELORE CONFINADOS**

TÁSSIA VELUMA BARBOSA CARRARA

Zootecnista

ORIENTADOR: Prof. Dr. MÁRIO DE BENI ARRIGONI

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. DANILO DOMINGUES MILLEN

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do Título de
Mestre.

BOTUCATU-SP

FEVEREIRO/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

C313e Carrara, Tássia Veluma Barbosa, 1989-
Efeito das frequências de alimentação sobre o desempenho, características de carcaça e saúde ruminal de bovinos nelore confinados / Tássia Veluma Barbosa Carrara. - Botucatu : [s.n.], 2015
ix, 46 f. : il. color , tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2015

Orientador: Mário de Beni Arrigoni
Coorientador: Danilo Domingues Millen
Inclui bibliografia

1. Bovino de corte. 2. Bovino - Alimentação e rações. 3. Carcaças. 4. Acidose. I. Arrigoni, Mário de Beni. II. Millen, Danilo Domingues. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

Dedicatória

Aos meus pais VALTER E TEREZINHA, a minha avó LUIZA, aos meus irmãos ALEXANDRE E LEANDRO, e ao meu namorado DIEGO, pelo amor, companheirismo e incentivo, sempre.

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Deus, por mostrar que seus planos são maiores que os meus e iluminar minha trajetória.

À minha mãe, amiga e conselheira Terezinha, pelo amor incondicional, palavras de incentivo, por todos os abraços nas horas mais difíceis e por nunca medir esforços para proporcionar a mim uma ótima formação acadêmica e pelo exemplo de força e vontade de vencer que me mostra a cada dia.

Ao meu pai Valter, por estar presente ao meu lado e em meu coração, mostrando que o amor ultrapassa o entendimento humano, por mesmo inconsciente, me passar a vontade de estudar ao te ver estudar, e por acreditar que esse seria o melhor caminho para eu seguir.

Ao meu irmão Ale pela companhia em todos os momentos, inclusive nos momentos de coxinha e Chija! Por me ajudar a ser quem eu sou hoje, por me fazer entender que não importa o que aconteça, Deus tem um plano para cada um de nós, e ninguém pode roubar isso.

Ao meu irmão Doda, por sempre me incentivar a estudar, por não me deixar desistir e acreditar em meu potencial, e por dizer que quanto mais espinhas na testa melhor, pois era sinal de inteligência! Obrigada também pelos churrascos!

Ao meu namorado Diego, por todo amor, por nunca me deixar desistir, pelo companheirismo, paciência, compreensão, confiança, por ter ficado ao meu lado todo esse tempo, e acreditar no meu potencial... Você fez essa caminhada ser mais fácil!

A toda a minha família por estar ao meu lado, e pelas palavras de apoio, Breu, Marcu, Aluizio, Mimo, Jota, Vinicéia, Jô, Dinda, Ka, vocês são muito importantes para mim.

Ao Prof. Dr. Danilo D. Millen, por ter me aceitado em sua equipe e me inspirado a buscar o conhecimento a cada dia, por toda atenção, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Mario de Beni Arrigoni, pela atenção e ajuda, sempre. E por me incentivar a continuar nesta profissão.

À Profa. Dra. Flavia Verechia por me passar a paixão por histologia desde os primeiros anos de graduação.

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Factori, pelo excelente exemplo de profissionalismo, companheirismo e humildade.

Ao Prof. Dr. Roberto de Oliveira Roça, pela disponibilidade, incentivo e conselhos.

A minha amiga Juliana (Core), pela companhia e apoio nas horas e momentos mais difíceis no alto daquele cume, pelas muitas risadas, pelas aventuras e ajuda. Obrigada “Irmão”, você foi essencial para eu chegar até aqui! Aooow Calango Véio!

Ao meu companheiro de mestrado Murillo Ceola, por toda ajuda, trabalho árduo e disposição.

Aos meu amigo Eduardo Estevanato (oooo Du), pela companhia, risadas e whisky!

A todos que me ajudaram Daniel Vicari, Cassiele, Ivan, Carol, Dunha, Bugrão, Robert, Cunhado, Gabriel, Frei, Xoxô e Verena, vocês foram essenciais!

Ao meu amigo Felipe Garcia, pela amizade sempre e pela frase que guiou minha vida;
“Gorda, faz zootecnia que você vai gostar!”

Ao meu amigo Wellington (Cabeça), por continuarem tão presentes esses anos todos,
e provar que distância não acaba com amizades verdadeiras!

À Agencia Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), aos pesquisadores Daniel Cardoso e Gustavo Pavan Mateus, e todos os funcionários, Zé Botinha, Jomar, Natal, Jeremias, Adilson, Dedé, Sr. Jurado, Gimenez, Luizinho, Raimundo, Lorival, Zé Maria, Lorediane e Maria, por toda disponibilidade e ajuda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP.

À todos que não foram aqui citados e que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa.

Não deixe que seus medos tornem-se obstáculos nos caminhos de seus sonhos, pois se você não mudar a direção, terminará exatamente onde começou.

Provérbio Chinês

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	11
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
REVISÃO DE LITERATURA.....	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
CAPITULO 2.....	24
EFEITO DAS FREQUÊNCIAS DE ALIMENTAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA E SAÚDE RUMINAL DE BOVINOS NELORE CONFINADOS.....	25
RESUMO.....	25
ABSTRACT	26
INTRODUÇÃO.....	27
MATERIAL E MÉTODOS	28
RESULTADOS	37
DISCUSSÃO	41
CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	45

LISTA DETABELAS

Tabela 1. Composição e conteúdo nutricional das dietas experimentais.....	29
Tabela 2. . Representação do manejo alimentar que foi adotado para os animais durante o estudo de acordo com a frequência de alimentação.	30
Tabela 3. Desempenho e características de carcaça de bovinos Nelore confinados submetidos a diferentes.....	38
Tabela 4. Médias relacionadas ao número de papilas por cm ² de parede ruminal(NMP), área das papilas por cm ² (AMP),superfície absorviva expressa em cm ² por cm ² de parede (ASA), representatividade das papilas na superfície absorviva (RPSA) e incidência de rumenites (RUM) de animais submetidos a diferentes frequências de alimentação.	39
Tabela 5. Médias relacionadas à altura, largura e área, espessura da faixa de queratina (EFQ), células em células em mitose e índice mitótico (IM) das papilas ruminais de animais submetidos a diferentes frequências de alimentação.....	40
Tabela 6. Médias relacionadas à Células em proliferação e em morte, total de células, índice de proliferação e morte celular das papilas ruminais de animais submetidos a diferentes frequências de alimentação.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cortes histológicos longitudinais de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação: A) Exemplificação da metodologia utilizada para aferição da largura das papilas ruminais. B) Exemplificação da metodologia utilizada para aferição da altura do epitélio ruminal. C) Exemplificação da metodologia utilizada para aferição da espessura do epitélio queratinizados das papilas ruminais. Método HE. 5x.....33

Figura 2. Corte histológico longitudinal de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação, exemplificando a metodologia utilizada para aferição da área papilar. Método HE. 5x.....34

Figura 3. Corte histológico longitudinal de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação, evidenciando núcleos com figuras de mitose. Método HE. 5x.....34

Figura 4. Corte histológico longitudinal de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação; A) corte representando a técnica utilizada para contabilizar a proliferação celular em papila ruminal. Círculo preto evidenciando núcleo celular e círculo vermelho núcleos em proliferação. B) Corte representando a técnica utilizada para contabilizar a morte celular em papila ruminal. Círculo preto evidenciando núcleo celular e círculo vermelho núcleos em morte celular. Método Imunohistoquímica. 20x.....36

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O aumento da demanda por alimento, impulsionado pelo crescimento populacional e elevação da renda da população, resultou em aumento de 2,77% ao ano o consumo de carne bovina, segundo levantamentos feitos pela Assessoria de Gestão Estratégica do Ministério da Agricultura (2013). Esta situação vem pressionando os produtores nacionais para a intensificação dos sistemas de produção de bovinos de corte, atentando-se ainda para que esta seja feita de forma a minimizar os impactos ambientais. Deste modo, a utilização de confinamentos vem se tornando cada vez mais importante para a cadeia produtiva de carne bovina, em que no ano de 2013, foram confinados cerca de 4,3 milhões de cabeças de bovinos no Brasil (IMEA, 2014),

Contudo, o uso de rações com elevados teores de energia ou carboidratos não fibrosos, principalmente o amido, utilizados na fase de terminação, resulta em aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta, assim como de ácido láctico pelos microrganismos do rúmen, o que pode levar a problemas de ordem digestiva como a acidose, frequentemente acompanhados de diminuição e grande flutuação na ingestão de massa seca, baixo ganho de peso e lesões na parede do rúmen (PRESTON, 1998).

Para que tais prejuízos possam ser minimizados, de forma a diminuir o impacto da fermentação excessiva dos carboidratos no rúmen, algumas estratégias de manejo alimentar dos animais podem ser adotadas, tais como: adaptação gradual à dieta, maior intervalo entre tratos e horários dos mesmos, maior frequência de fornecimento da ração nos currais e monitoramento da ingestão de massa seca (CERVIERI et al., 2009).

Em geral, os confinadores ou seus nutricionistas adotam sistema de fornecimento das rações, horário e frequência de tratos, levando em consideração apenas o número de bovinos confinados, as instalações nas quais os animais são mantidos, equipamentos disponíveis e quantidade de baias a serem abastecidas, por não haver trabalhos na literatura brasileira, embasados em conceitos nutricionais, que auxiliem o confinador a adotar a frequência de alimentação mais adequada para que o animal apresente desempenho produtivo máximo (MILLEN et al., 2009).

Desta forma, o objetivo deste estudo, foi avaliar o efeito das diferentes frequências alimentares adotadas sobre o desempenho produtivo, características de carcaça, morfologia, histologia e imuno-histoquímica do epitélio ruminal de bovinos Nelore confinados.

Os resultados desse estudo serão apresentados no capítulo 2 desta dissertação.

REVISÃO DE LITERATURA

Acidose ruminal como consequência da frequência alimentar

A manutenção de um ambiente ruminal menos ácido e, portanto, passível de absorção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), torna-se necessário para evitar grandes prejuízos econômicos no sistema de produção de bovinos de corte. Para tanto, várias ferramentas de manejo podem ser adotadas com o intuito de prevenir ou controlar a acidose, que pode ser definida como a redução do conteúdo alcalino do fluido corporal em relação ao conteúdo ácido (OWENS et al., 1998). A grande proporção de carboidratos rapidamente fermentáveis presente nas rações de bovinos de corte está diretamente relacionada com a incidência de acidose, o que provoca várias mudanças ruminais como: aumento da disponibilidade de glicose livre, estímulo no crescimento de diversas bactérias, aumento da produção de AGCC, principalmente o ácido láctico, redução do pH e da motilidade do rúmen e aumento da susceptibilidade a distúrbios ruminais consequentes da acidose (OWENS et al., 1998), como laminites e abscessos de fígado, além da diminuição do consumo de massa seca por saciedade química.

Durante o processo de acidificação do rúmen, ocorrem quedas bruscas ou flutuações de pH, que resultam em morte de alguns microrganismos ruminais, dentre os quais podem estar incluídas bactérias amilolíticas, responsáveis pela degradação do amido no rúmen e produção de parte do propionato. Com o desaparecimento desta classe de microrganismos, pode haver comprometimento da digestibilidade deste nutriente e um possível quadro de acidose ruminal, reduzindo o desempenho e afetando a saúde animal. Da mesma forma, valores de pH menores que 6,0 afetam o metabolismo de microrganismos celulolíticos o que leva à redução da degradação de fibras no rúmen (OWENS et al., 1998).

Segundo Millen et al. (2009), em pesquisa realizada com nutricionistas brasileiros de bovinos de corte em confinamento, 52% dos entrevistados responderam que a acidose ou problemas ligados à acidose (laminites e timpanismo) é o segundo maior problema relacionado à saúde de bovinos confinados no país.

Robinson e Mcniven (1994) sugerem que o aumento da frequência de alimentação promove redução da flutuação da produção de AGCC e do pH ruminal, o que atribui a este manejo resultados positivos com relação à diminuição da incidência de acidose e distúrbios advindos desta como a rumenite, evidenciada quando há desenvolvimento de alterações inflamatórias no epitélio ruminal, a qual tem como principal causa processos fermentativos inadequados no interior do rúmen. Vechiato (2009) estudou a frequência e tipo dessas lesões ruminais em bovinos terminados em

regime alimentar de confinamento e observou que a incidência de rumenites foi 11,9% maior, à medida que foram adotadas dietas com maiores inclusões de concentrado.

Estudos nacionais referentes às rumenites, realizados por Costa et al. (2008), têm sido descritos quanto à ação de certos ácidos em predispor lesão ruminal e, consequentemente, quadros de rumenites. Estes autores relataram que o propionato foi o AGCC que mais colaborou para o crescimento fisiológico de papilas metabolicamente ativas e que tanto lactato quanto o butirato podem causar lesões às papilas quando concentrações acima do normal são encontradas. Contudo, quando menores frequências de alimentação são adotadas, o pH ruminal poderá sofrer queda, e a eficiência das bactérias amilolíticas também pode decrescer, o que aumenta a proporção lactato:propionato devido a maior ação de bactérias produtoras de lactato no rúmen quando este encontra-se com valores de pH inferiores a 5,6; o que gera lesões e reduz a possibilidade de crescimento das papilas e desempenho animal.

Depois de instalado quadro de rumenite, as barreiras físicas de defesa dos animais estão comprometidas devido à lesão originada, o que facilita a migração de bactérias ruminais, em especial as da espécie *Fusobacterium necrophorum*, para a corrente sanguínea. Essas bactérias, após atravessarem o epitélio ruminal, atingem a circulação portal e chegam ao fígado, ocasionando infecção e formação de abscessos. Os abscessos são inflamações purulentas que promovem a formação de uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, causado por bactérias normalmente anaeróbicas (NAGARAJA e LECHTENBERG, 2007) e, como consequência, reduzem o desempenho animal e a produção de carcaça.

Frequência de alimentação e sua relação com o desempenho produtivo

Atualmente, no sistema de confinamento, a frequência de alimentação é um fator de extrema importância para os produtores e, segundo Arthur et al. (2004), seria o componente de maior custo na maioria dos empreendimentos pecuários. Seu aumento pode diminuir a incidência de acidose devido a menor quantidade de energia ou amido ingerido por oferta de alimento, gerando condições mais estáveis no rúmen.

Segundo Yang e Varga (1989), o efeito mais importante da frequência de alimentação sobre o ambiente ruminal é que o aumento desta variável reduz as flutuações de pH, reduzindo assim a flutuação da ingestão de massa seca (IMS), parâmetro ligado ao aparecimento de distúrbios digestivos como a acidose, quando bovinos são alimentados com dietas que contém elevados teores de energia (FULTON et al., 1979).

Britton e Stock (1987) citam que, para bovinos confinados que recebem rações com altos teores de energia, a flutuação da IMS, além de causar perturbações

digestivas, diminui o desempenho e crescimento animal.

Desta forma, com alimentação mais frequente, à IMS seria mais uniforme com as atividades de ingestão e ruminação mais distribuídas ao longo do dia, o que aliviaria as flutuações de pH e minimizaria o surgimento de distúrbios digestivos.

O desempenho animal está diretamente ligado à IMS, pois 60 a 90% do desempenho decorre da variação da ingestão, enquanto que 10 a 40% advêm de flutuações na digestibilidade dos nutrientes, como citado por Mertens (1994), sendo então a ingestão considerada o fator crucial na determinação do desempenho animal.

Esta afirmação tem como base o fato de que a variação na IMS de dietas de alta energia comprometem a manutenção do pH ruminal em patamares adequados para fermentação ruminal ideal, visando o máximo rendimento microbiano (pH ruminal > 5,6; McAllister et al., 2002), situação que pode ser ocasionada devido à baixa frequência alimentar, ocasionando distúrbios digestivos e decréscimos na produção.

De acordo com Van Soest (1994), a IMS é controlada por vários fatores que variam de acordo com a situação, o que pode estar ligado ao animal, ao alimento e a fatores ambientais e de manejo, como tempo de acesso ao alimento, frequência de alimentação e comportamento ingestivo.

DeVries e von Keyserlingk (2005) avaliaram 48 vacas holandesas alojadas em confinamento, alimentadas uma ou duas vezes ao dia e notaram que o fornecimento de alimento fresco é um estímulo substancial para a ingestão, concluindo que a maior frequência de fornecimento de alimento fresco às vacas leiteiras pode contribuir significativamente para a distribuição e até aumento da ingestão ao longo do dia.

De acordo com Jezierski e Podluzny (1984), tal resultado pode estar associado ao aumento da concorrência entre as vacas, fator que pode levar algumas vacas a modificarem seus hábitos de alimentação para evitar interações agressivas. Em outro estudo com vacas leiteiras, Mäntysaari et al. (2006) observaram a IMS de animais expostos a um ou cinco tratos diários e, da mesma forma, notaram maior IMS e maior uniformidade de ingestão ao longo do dia quando maiores frequências alimentares foram adotadas, enquanto que as vacas alimentadas apenas uma vez por dia apresentaram pico de consumo logo após a oferta de alimento. No entanto, faltam estudos com bovinos de corte confinados no tocante aos efeitos de diferentes frequências de alimentação sobre a IMS e desempenho animal, pois a frequência alimentar acarreta em alterações no padrão de distribuição das atividades ao longo do dia (FISCHER et al., 2002).

Diferentes frequências alimentares adotadas por técnicos e produtores podem levar a uma série de distúrbios metabólicos advindos da acidose, pois a menor frequência de alimentação poderá fazer com que a quantidade de energia ingerida

pelo animal, promova redução brusca do pH ruminal e aumento da concentração de metabólitos sanguíneos, o que inibe a IMS na próxima oferta de alimento, ou leva à seleção de ingredientes da ração que proporcione “sensação de conforto”. Este fator poderá diminuir significativamente o desempenho animal, pois os ruminantes, como outras espécies, procuram ajustar o consumo alimentar às suas necessidades nutricionais, especialmente de energia (ARNOLD, 1985).

Morfologia e histologia ruminal relacionadas com a frequência alimentar

O conhecimento da morfologia e histologia do rúmen, bem como sua capacidade de absorção, tendem a auxiliar no esclarecimento das causas que levam à ocorrência de distúrbios metabólicos, como a acidose, e suas consequências à saúde ruminal.

As papilas ruminais são projeções da túnica mucosa para o lúmen do órgão e são responsáveis por aumentar a área de superfície de contato, ou seja, a área de troca entre o conteúdo ruminal e a corrente sanguínea. Elas são formadas de um centro de tecido conjuntivo coberto por epitélio (DOBSON et al., 1976) e sua proliferação celular ocorre a partir da camada basal, onde as células entram em divisão mitótica, conforme a necessidade de suprimento celular do epitélio, onde sofrem diferenciação e migram para as demais camadas do epitélio até alcançar a camada córnea e descamar para dentro do lúmen ruminal (LAVKER e MATOLTSY, 1970).

O tamanho e o formato das papilas são completamente dinâmicos e sujeitos às mudanças da dieta (CUNNINGHAN, 1992). Além de participarem do mecanismo de movimento da ingesta (D'ARCE e FLECHTAMANN, 1979), aquelas são responsáveis pelo aumento da área absorptiva, pois a maior parte da absorção de AGCC e outros metabólitos ocorre em nível de papilas ruminais (BANKS, 1991), sendo que esses AGCC servem como estimuladores do desenvolvimento das papilas como citado por Cunningham (1992). Isso explica o fato de que nas áreas de maior absorção há maior desenvolvimento de papilas ruminais.

Contudo, a ingestão de dietas ricas em carboidratos rapidamente fermentáveis pode resultar em acúmulo excessivo de AGCC no fluido ruminal, o que pode levar o animal a quadros de desordens metabólicas, como acidose, timpanismo e ainda causar lesões no epitélio do rúmen, o que diminui sua capacidade absorptiva e motilidade, gerando perdas econômicas e de desempenho se o animal não estiver totalmente adaptado.

Parra et al. (2011) estudaram os efeitos de protocolos de adaptação à dietas com elevados teores de concentrado com duração de 14 ou 21 dias sobre as papilas

ruminais de bovinos Nelore em confinamento. Relataram que os animais submetidos ao protocolo de 21 dias apresentaram papilas com menor grau de lesão e maior capacidade de absorção em relação aos que foram expostos ao protocolo mais curto.

Sakata et al. (1980) descreveram que o rúmen se adapta ao aumento na ingestão de rações de alta energia por meio da hiperplasia das células epiteliais, e que os AGCC, provenientes da fermentação ruminal, estimularam a mitose do epitélio ruminal em carneiros. Em estudo conduzido por Costa et al. (200), os AGCC contribuíram para o aumento da proliferação celular da camada basal do epitélio ruminal, mas somente o propionato tendeu a aumentar o tamanho de papilas no saco cranial do rúmen. De acordo com Soto-Navarro et al. (2000), a menor frequência de tratamentos acarreta em diminuição de propionato no rúmen, não favorecendo assim o crescimento das papilas.

Resende Júnior et al. (2006), ao fornecerem rações de alta energia uma ou quatro vezes para vacas não lactantes, observaram que a menor frequência de alimentação resultou em maior índice mitótico da camada basal do epitélio ruminal, o que implica que o aumento do índice mitótico reflete em maior desenvolvimento das papilas e, conseqüentemente, maior área de absorção.

Imuno-histoquímica do epitélio ruminal

Grande parte dos tecidos epiteliais sofrem renovação celular em razão do equilíbrio celular entre a proliferação e a morte celular, caracterizada por processo ativo de alterações bioquímicas e morfológicas, denominada apoptose (STRANSER et al., 2000), em que ocorre condensação citoplasmática, sem rompimento da membrana celular, e formação de corpos apoptóticos, que são prontamente reconhecidas e ingeridas por fagócitos locais, processos que impedem as reações inflamatórias nos tecidos adjacentes (MARTINS FILHO, 2008)

Há diversos fatores envolvidos na ativação da apoptose, mas, certamente, os genes apresentam um papel controlador especial, em que pelo menos três genes têm um papel indutor sobre o processo apoptótico: os genes morte celular-3 (ou Cell Death-3), MC-4 (Ced-4) e MC-10 (Ced-10). O produto da expressão do gene Ced-3 é um conjunto de proteases apoptóticas ricas em cisteína, conhecidas como “caspases” (cysteine-containing aspartases), que clivam peptídios em sítios contendo resíduos do aminoácido ácido aspártico (FERRARI et al., 2007).

A apoptose é ativada quando ocorre invasão de genes patogênicos ou mesmo quando há lesão interna do DNA, como nos casos de acidificação do meio ruminal, por isso é considerada um mecanismo de defesa.

O uso da frequência alimentar inadequada para bovinos confinados aliada a

dietas com alta concentração de carboidratos rapidamente fermentáveis pode causar lesões no epitélio ruminal, sendo essa uma das formas de indução da apoptose.

Quando esta ocorre, as caspases são ativadas, degradando proteínas nucleares e do citoplasma. O núcleo celular torna-se picnótico, entra em colapso e se fragmenta. Os corpos apoptóticos, que são prolongamentos de membrana, são fagocitados por macrófagos, o que caracteriza processo de morte celular, sem haver processo inflamatório. Por outro lado, animais que recebem alimentação em intervalos de tempo adequados podem apresentar maior proliferação celular, pois as oscilações do pH ruminal acontecem de forma constante, proporcionando estabilidade das fermentações e promovendo absorção da quantidade crescente de ácidos graxos de cadeia curta que estará sendo produzida devido ao fornecimento de rações com altos teores de energia.

Desta forma, estudar a proliferação e morte celular no epitélio ruminal de bovinos Nelore confinados submetidos a distintas frequências de alimentação com rações que contém elevados níveis de concentrado torna-se importante, pois podem servir como subsídio para determinar o número ideal de tratos diários para bovinos Nelore confinados, assim como a intensidade de lesões, se houver.

O epitélio de revestimento do rúmen é do tipo estratificado pavimentoso queratinizado, de espessura variável, formado por quatro camadas de células distintas: basal, espinhosa, granulosa e córnea ou queratinizada. A camada basal é a parte germinativa do epitélio, onde ocorre a proliferação celular para crescimento e renovação epitelial, expressa por alta atividade mitótica (PEREIRA, 1997).

Após a divisão mitótica das células, essas sofrem diferenciação, ou seja, queratinização, e migram para as camadas superiores do epitélio, até alcançarem a camada córnea e descamar para dentro do lúmen ruminal (DELLMAN & BROWN, 1982; BANKS, 1992). A velocidade relativa dos processos de proliferação celular, diferenciação e descamação determina o número de células em cada camada do epitélio.

Goodlad (1981) alimentou carneiros por um período com dieta à base de forragem, seguido por outro período de alimentação exclusivamente com concentrados por vários meses. A taxa de proliferação celular da camada basal do epitélio na transição de forragem para concentrado foi de 32,7%, e após vários meses de fornecimento de concentrado, essa taxa foi de 17,3%. Os animais que foram alimentados somente com forragem durante todo o período experimental apresentaram taxa de proliferação celular de apenas 9,0% ao final do estudo. Esses dados indicam que o ato de introduzir ingredientes concentrados na alimentação estimula mais a proliferação celular, possivelmente por que na transição de dietas à

base de forragens para outras a base de concentrado, uma massa celular bem maior deve ser atingida para possibilitar a absorção e metabolização eficiente da maior quantidade de AGCC que serão produzidos. Uma vez atingida essa massa, a proliferação epitelial cai a uma taxa capaz de possibilitar a reposição de células metabolicamente vivas.

Costa (2003) avaliaram alterações morfológicas induzidas por infusões de butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal de bezerros e observaram que todos os AGCC contribuíram para o aumento da proliferação celular da camada basal do epitélio ruminal, mas somente o propionato tendeu a aumentar o tamanho de papilas no saco cranial do rúmen.

Grande parte dos tecidos sofre renovação celular em razão do equilíbrio celular entre a proliferação celular e a morte celular, caracterizada por um processo ativo de alterações bioquímicas e morfológicas, denominada apoptose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARNOLD, G.W. Ingestive behavior. In: FRASER, A.F. (Ed.) **Ethology of farm animals**. Amsterdam: Elsevier, p. 186. 1985.
- ARTHUR, P.F.; ARCHER, J.A.; HERD, R.M. Feed intake and efficiency in beef cattle: overview of recent Australian research and challenges for the future. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v.44, p.361-369, 2004.
- BANKS, W. **Histologia Veterinária Aplicada**. São Paulo: Editora Manole. 1991
- BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole,. 629 p. 1992.
- BRITTON, R.A.; STOCK, R.A. Acidosis, rate of starch digestion and intake. In: F.N. Owens (Ed.) **Symposium Proceedings: Feed Intake by Beef Cattle**. Publ. MP, 121. p125. Oklahoma State Univ., Stillwater. 1987.
- CERVIERI, R.C.; CARVALHO, J.C.F.; MARTINS, C.L. Evolução do Manejo Nutricional nos Confinamentos Brasileiros: Importância da Utilização de Subprodutos da Agroindústria em Dietas de Maior Inclusão de Concentrado. In: **Simpósio Internacional de Nutrição de Ruminantes**, 2., 2009, Botucatu. Recentes avanços na nutrição de bovinos confinados: anais... Botucatu: UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas, p.2-22, 2009.
- COSTA, C.; ARRIGONI, M.D.B.; SILVEIRA, A.C. et al. Desempenho de bovinos superprecoces alimentados com silagem de milho ou feno de aveia e grãos de milho ensilados ou secos. **Acta Scientiarum of animal Science**, Maringá, v.24, n.4, p.1175-1183, 2002.
- COSTA, S.F. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e epiderme de bezerros. 110p. **Tese** (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2003.
- COSTA, S.F.; PEREIRA, L.Q.; RESENDE JÚNIOR, J.C. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros – I Aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Lavras, MG, v.60, n.1, p.1-9, 2008.
- CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p. 454., 1992.
- D'ARCE, R.D. and FLECHTMANN, C.H.W. **Introdução a Anatomia e Fisiologia Animal**. São Paulo: Nobel. 1979.
- DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 397 1982.

- DEVRIES, T.J.; von KEYSERLINGK, M.A.G.; BEAUCHEMIN, K.A. Frequency of feed delivery affects the behavior of lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**. 88:3553–3562. 2005.
- DOBSON, A.; SELLERS, A.F.; GATEWOOD, V.H. Absorption and exchange of water across rumen epithelium. **American Journal of Physiology**, v.231, n.5, p.1588-1594.1976.
- FERRARI, D.; PINTON, P.; SZABADKAI, G.; CHAMI, M.; CMAPANELLA, M.;POZZAN, T.; RIZZUTO, R. Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca²⁺ handling in apoptosis. **Cell Calcium**, 413-20, 2007.
- FISCHER, V.; DESWYSEN, A.G.; DUTILLEUL, P. et al. Padrões da distribuição nictemeral do comportamento ingestivo de vacas leiteiras, ao início e ao final da lactação, alimentadas com dieta à base de silagem de milho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.5, p.2129-2138, 2002.
- FULTON, W.R.; KLOPFENSTEIN, T.J.; BRITTON, R.A. Adaptation to high concentrate diets by beef cattle. I. Adaptation to corn and wheat diets. **Journal Animal Science**., v.49, p.775-784, 1979.
- GOODLAD, R.A some effects of diet on the mitotic index and the cell cycle of the ruminal epithelium of sheep. **Quarterly Journal of Experimental Physiology**, Cambridge, v.66, n.4, p.487-499. 1981.
- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.
- INSTITUTO MATO-GROSSE DE ECONOMIA AGRÍCOLA – IMEA. Disponível em: <<http://imea.com.br/noticias.php?pagina=imea>>. Acesso em: 31 maio, 2014
- JEZIERSKI, T.A.; PODLUZNY, M . Uma análise quantitativa do comportamento social diferentes cruzamentos de gado leiteiro em habitação solto e sua relação com produtividade. **Appl. Animal Behavior. Sei** 31-40, 1984.
- LAVKER, R.M.; MALTOLTSY, A.G. The fate of cell organelles and differentiation products in ruminal epithelium. **Journal Cell Biology**, New York, v.44, p.501. 1970.
- MÄNTYSAARI, P.; KHALILI, H.; SARIOLA, J. Effect of feeding frequency of a total mixed ration on the performance of high-yielding dairy cows. **Journal Dairy Science** 4312- 4320. 2006.
- MARTINS FILHO, J.P. Avaliação clínica, laboratorial, histológica e do uso da heparina sódica na fase prodrômica da laminite induzida por sobrecarga de carboidrato. Jaboticabal; Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, **Dissertação**, p.58, 2008.

- McALLISTER, T.A., K.S. SCHWARTZKOPFGENSWEIN, K.E. BEAUCHEMIN, D.J. GIBB, M.N. STREETER, D.D. HICKMAN & D.H. CREWS. 2002. Metabolic consequences of feeding behavior and intake in feedlot cattle. **Journal Animal Science** 80, Suppl. 1: 112-113, 2002
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: Forage Quality, Evaluation, and Utilization, Wisconsin. **Proceedings...** Wisconsin: p.450-493. 1994.
- MILLEN, D.D.; PACHECO; R.D.L.; ARRIGONI, M.D.B. et al. Feedlot performance of Nellore and Brangus cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. **Journal Animal Science**, v.87, ESuppl.2, p.282, 2009.
- NAGARAJA, T. G., K. F. LECHTENBERG. **Acidosis in Feedlot Cattle**. Vet. Clin. Food Animal. 23:333–350, 2007
- OWENS, F.N.; SECRIST, D.S.; HILL, W.J. et al. Acidosis in cattle: A review. **Journal Animal Science**, v.76, p.275-286, 1998.
- PAROLIN, M. B., REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de doenças hepato-biliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.
- PARRA, F. S.; RONCHESEL, J. R.; ARRIGONI, M. D. B.; MARTINS, C. L.; et al 2011. Effects of restricted versus conventional dietary adaption over periods of 14 and 21 days on rumen papillae of feedlot Nellore cattle. **Journal Animal Science**. Trabalho aceito para publicação. 2011.
- PEREIRA, J. R. A.; JUNIOR, P.R. **Manual Prático de Avaliação Nutricional de Alimentos**. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz. FEALQ. Piracicaba. São Paulo. 34. 1997.
- PRESTON, R.L. Management of high concentrate diets in feedlot. In: Simpósio sobre Produção Intensiva de Gado de Corte, Campinas. **Anais...**Campinas: CBNA, p.82-91.1998.
- RESENDE JÚNIOR, J.C.; ALONSO, L.S.; PEREIRA, M.N. et al. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 526-536, 2006.
- RICCI J.E., GOTTLIEB R.A., GREEN D.R. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and degeneration of reactive oxygen species during apoptosis. **Journal of Cellular Biology**, v. 160, p. 65-75, 2003.
- ROBINSON, P.H.; MCNIVEN, M.A. Influence of flame roasting and Feeding frequency of barley on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.3631-3643, 1994.

- SAKATA, T.; HIKOSAKA, K.; SHIOMURA, Y. AND TAMATE, H. Stimulatory effect of insulin on ruminal epithelium cell mitosis in adult sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 44, n. 3, p. 325-331. 1980.
- SOTO-NAVARRO, S.A.; KREHBIEL, C.R.; DUFF, G.C. et al. Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient of digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. **Journal Animal Science**, **78**:2215–2222. 2000.
- STRANSSER A.; O'CONNOR L.; DIXIT V.M. Apoptosis signaling. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p. 217-245, 2000
- VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON J.B.; LEWIS B.A. Symposium: Carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science** 74:3583-3597, 1991.
- VECHIATO, T.A.F. **Estudos retrospectivos e prospectivos da presença de abscessos hepático em bovinos abatidos em um frigorífico paulista**. Dissertação de Mestrado, 2009.
- YANG, C.M.J.; VARGA, G.A. Effect of three concentrate feeding frequencies on rumen protozoa, rumen digesta kinetics, and milk yield in dairy cows. **Journal Dairy Science** 72:950–957, 1989.

CAPITULO 2

EFEITO DAS FREQUÊNCIAS DE ALIMENTAÇÃO SOBRE O DESEMPENHO, CARACTERÍSTICAS DE CARÇAÇA E SAÚDE RUMINAL DE BOVINOS NELORE CONFINADOS

RESUMO: O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos das diferentes frequências de alimentação sobre o desempenho, características de carcaça e saúde ruminal de bovinos Nelore confinados. Foram utilizados 48 machos inteiros, com idade média de 18 meses e peso vivo médio inicial de $358,2 \pm 19,4$ kg, blocados por peso e divididos em quatro tratamentos: 1) fornecimento da ração uma vez por dia (1x; 8:00), 2) fornecimento da ração duas vezes por dia (2x; 8:00 e 14:00), 3) fornecimento da ração três vezes por dia (3x; 08:00, 11:00 e 14:00), e 4) fornecimento da ração quatro vezes ao dia (4x; 08:00, 11:00, 14:00 e 17:00), caracterizando assim um delineamento de blocos casualizados, com 12 repetições (1 animal/baia), em que baia considerada a unidade experimental. O período experimental foi de 94 dias, sendo que o programa de adaptação consistiu em alimentação *ad libitum* de duas dietas de adaptação ao longo do período de 9-d com o aumento do nível de concentrado de 60% para 72%, seguido de 86% da matéria seca. Regressão polinomial foram utilizados para avaliar a relação linear, quadrática e cúbica entre a frequência de alimentação e a variável dependente. O aumento da frequência alimentar afetou de forma linear o peso vivo final, ganho de peso diário, eficiência alimentar, células em mitose, índice mitótico, total de células e células em proliferação. O peso de carcaça quente foi afetado de forma linear e cúbica, bem como a altura e área das papilas ruminais. Com base nos resultados, a frequência de alimentação de três vezes ao dia proporcionou aos animais maiores valores para área e altura das papilas ruminais, e maior peso de carcaça quente e, por isso, recomenda-se alimentar bovinos Nelore confinados no mínimo três vezes ao dia.

Palavras-chave: *Bos indicus*, acidose, papilas ruminais

Effects of feeding frequencies on feedlot performance, carcass traits and ruminal health of feedlot Nellore cattle

ABSTRACT: The objective of this study was to determine the effects of different feeding frequencies on performance, carcass characteristics and rumen health of feedlot Nellore. 48 males were used, with an average age of 18 months and average live weight of 358.2 ± 19.4 kg, blocados by weight and divided into four treatments: 1) providing the feed once a day (1x; 8: 00) 2) supplying the feed twice a day (2x; 8:00 to 14:00), 3) providing three times daily ration (3x, 08:00, 11:00 and 14:00), and 4) supply of feed four times a day (4x; 08:00, 11:00, 14:00 and 17:00), characterizing a randomized block design with 12 repetitions (1 animal / pen), where pen considered the experimental unit. The experimental period was 94 days, and the adaptation program consisted of ad libitum feeding both diets throughout the adaptation 9d period with the increase in the level of concentrate 60% to 72% followed by 86% the dry matter. Regression coefficients were used to assess the linear, quadratic and cubic relationship between power and frequency dependent variable. Increased food frequency affected linearly final body weight, daily gain, feed efficiency, cells in mitosis, mitotic index, total cells and proliferating cells. The hot carcass weight was affected linear and cubic shape and the height and area of rumen papillae. Based on the results, three times daily feed provided to the animals frequency higher values for the area and height of the ruminal papillae, and increased hot carcass weight and, therefore, it is recommended to feed Nellore confined at least three times day.

Keywords: *Bos indicus*, acidosis, rumen papillae

INTRODUÇÃO

A pecuária de corte brasileira, nos últimos anos, vem passando por mudanças significativas, o que tornou o Brasil, o segundo maior exportador e produtor mundial de carne bovina, com o número de 193.393.388 de cabeças confinadas, responsável em 2013, por 20% das exportações do produto (ANUALPEC, 2013).

Além do confinamento viabilizar o abate de bovinos mais jovens, com melhor acabamento de carcaça e aumentar o número de bovinos terminados em decorrência da maior velocidade de ganho de peso, o confinamento traz melhorias na qualidade da carcaça e promove a intensificação do uso da terra (RESTLE e VAZ, 2003). Desta maneira, para tais parâmetros serem alcançados torna-se imprescindível o fornecimento de dietas com elevados teores de energia, pois na fase de terminação o animal apresenta elevada exigência nutricional, principalmente se o ganho diário de peso desejado for alto (SANTOS et al., 2004).

Entretanto, essa ação pode acarretar em problemas de ordem digestiva, como a acidose, frequentemente acompanhados de diminuição e grande flutuação na ingestão de massa seca, baixo ganho de peso, lesões na parede do rúmen e aparecimento de abscessos hepáticos (PRESTON, 1998). Deste modo, a frequência de alimentação entra como uma importante ferramenta para minimizar os prejuízos decorrentes da acidose, ou evitar que estes ocorram, pois quando a frequência de alimentação é baixa, o que leva a aumentos na quantidade de ração fornecida por trato, pode ocorrer maiores quedas de pH do rúmen em determinados horários do dia.

Por outro lado, oferecer a ração total dividida em maior número de parcelas ao longo do dia pode diminuir o risco de distúrbios digestivos, pois a quantidade de energia ingerida pelo animal é menor em cada oferta, bem como a quantidade de amido. Isto proporciona ambiente ruminal mais favorável à degradação dos carboidratos pelas bactérias e evita quedas bruscas e flutuações de pH, melhorando desta maneira o desempenho animal. Porém, ao adotar este tipo de manejo, o custo operacional poderá sofrer aumento significativo, devido a maior quantidade de horas/máquina trabalhada, e a maior necessidade de mão de obra.

A adoção de apenas uma oferta de alimento por dia poderá levar o animal ao consumo excessivo de ração quando esta for ofertada, normalmente pela manhã, o que pode promover a queda do pH ruminal a níveis acidóticos, pelo excesso de ácidos graxos de cadeia curta liberados no rúmen. Desta maneira, quando o pH ruminal se encontra abaixo de 5,6, devido à fermentação excessiva, o consumo de alimentos é diminuído na tentativa de restaurar o pH ruminal para níveis adequados. Uma vez que o pH retorna a níveis adequados, o animal se sente "melhor" e volta a consumir em alta quantidade. Isso causa nova produção excessiva de ácidos no rúmen, o que faz

com que todo o ciclo se repita (SCHWARTZKOPF-GENSWEIN et al., 2003) e promova quadros de acidose, os quais levam a desempenhos insatisfatórios e até à morte.

Esta flutuação do consumo de matéria seca por prolongado período acarreta em lesões ao epitélio ruminal, o que diminui a capacidade absorptiva de ácidos graxos de cadeia curta e consequente diminuição da eficiência alimentar como um todo, pois os nutrientes da dieta não foram fermentados ou absorvidos de maneira efetiva através do rúmen.

Por outro lado, como no Brasil as rações de terminação utilizadas contém menor concentração de energia que rações americanas (MILLEN et al., 2009) devido à maior inclusão de subprodutos e forragens, assim como grãos de milho menos processados e de variedades “Flint”, a adoção de um arraçoamento por dia precisa ser testada em condições brasileiras, pois os estudos que relatam quadros de acidose em animais alimentados apenas uma vez por dia foram realizados em outros países, com bovinos *Bos taurus*, e com rações que continham mais energia, grãos mais processados e menores teores de forragem, o que poderia apresentar vantagens com relação ao custo operacional, devido ao menor dispêndio com máquinas trabalhando.

Assim sendo, o presente estudo visa avaliar o efeito de diferentes frequências de fornecimento do alimento em relação ao o desempenho produtivo, características de carcaça, morfologia, histologia e imunohistoquímica ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Local do Experimento

O estudo foi conduzido nas instalações do confinamento da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), no município de Andradina/SP. Foram utilizados 48 animais machos inteiros da raça Nelore, com peso vivo médio inicial de $358,2 \pm 19,4$ kg, contemporâneos, oriundos de um mesmo lote de matrizes, provindos de sistema de recria a pasto em que recebiam suplementação.

Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados formados em função do peso vivo inicial, em que os animais foram divididos em quatro tratamentos de acordo com a frequência de alimentação adotada: 1) fornecimento da ração 1x ao dia (8:00h), 2) fornecimento da ração 2x ao dia (8:00 e 14:00h), 3) fornecimento da ração 3x ao dia (8:00, 11:00 e 17:00h) e 4) fornecimento da ração 4x ao dia (8:00,

11:00, 14:00 e 17:00h). Cada tratamento foi composto por 12 animais (1 animal/baia), sendo a baia ou o animal considerados a unidade experimental para este estudo.

Manejo dos animais e Arraçoamento

O programa de recebimento dos animais foi da seguinte forma: todos foram desvermifugados, e submetidos a um período de pré-adaptação de 10 dias com o objetivo de uniformizar a população ruminal dos mesmos e adaptá-los às instalações e manejo. Os animais foram alojados em confinamento parcialmente coberto e mantidos em baias de piso de concreto de fácil limpeza com lotação de um animal por baia (7,4m² por animal e 1,0 m de cocho por animal) com água à vontade disponível em bebedouro automático.

O experimento teve duração de 94 dias, sendo nove dias de adaptação utilizando-se o protocolo *Step up* (escadas). As duas rações de adaptação continham 60 e 73% de concentrado, fornecidas durante 5 e 4 dias, respectivamente, sendo que no décimo dia do período experimental foi fornecido a todos os tratamentos a dieta de terminação com 86% de concentrado, sendo todas completas (TMR). As rações experimentais foram formuladas segundo o LRNS nível 2 (LARGE RUMINANT NUTRITION SYSTEM, FOX et al. 2004), cujos níveis estão apresentados na Tabela 1. As rações foram compostas por bagaço de cana *in natura*, feno de Tifton, milho moído grosso, farelo de soja, casca de soja e sal mineral contendo monensina sódica e ureia.

Tabela 1. Composição e conteúdo nutricional das dietas experimentais.

Dietas	Adaptação 1	Adaptação 2	Terminação
Nível de Concentrado (%)	60	73	86
<i>Ingredientes (% MS)</i>			
Bagaço de cana <i>in natura</i>	27,0	21,0	14,0
Feno de Tifton	13,0	6,0	0,0
Grãos de Milho Quebrados	39,8	53,4	67,0
Farelo de Soja	12,1	8,8	5,5
Casca de Soja	5,4	7,2	9,0
Suplemento Mineral com Uréia	2,7	3,6	4,5
<i>Conteúdo Nutricional</i>			
Matéria Seca (MS)	74	77	81,0
Nutrientes Digestíveis Totais (%MS)	66	71	76,0
Proteína Bruta (% MS)	14,2	14,0	14,0
Fibra em Detergente Neutro (% MS)	41,4	32,7	24,0
peNDF ¹ (%MS)	36,0	27,0	18,0
Ca ² (%MS)	0,46	0,53	0,59
P ³ (%MS)	0,29	0,3	0,31

¹ Fibra em detergente neutro fisicamente efetiva. ² Calcio. ³ Fósforo.

Os animais foram divididos em quatro grupos de 12 animais (repetições), para que cada grupo fosse alimentado com uma frequência de alimentação distinta, como mostrado na Tabela 2. As rações com fornecimento *ad libitum* foram submetidas a ajustes de quantidade diária a serem fornecidas, com base na quantidade de sobras nos cochos antes da primeira refeição (8:00h), a qual manteve-se entre 10% da quantidade ofertada. O consumo foi medido para cada baia todos os dias por meio da pesagem do alimento fornecido, e da pesagem das sobras antes do trato da manhã posterior, para que se pudesse além de aferir o consumo do dia anterior, ajustar o fornecimento do dia subsequente. A determinação do teor de matéria seca (MS) da dieta total foi efetuada todos os dias para se obter a ingestão de massa seca (IMS) diária/animal, em quilos. Ao final do estudo, o consumo de massa seca também foi avaliado em porcentagem do peso vivo (%PV).

Tabela 2. . Representação do manejo alimentar que foi adotado para os animais durante o estudo de acordo com a frequência de alimentação.

Frequência Diária de Alimentação	Proporção do Trato Total Fornecida (%)	Horários de Arraçoamento			
		8:00h	11:00h	14:00h	17:00h
1x	100	X	-	-	-
2x	40:60	X	-	X	-
3x	30:20:50	X	X	-	X
4x	25:15:20:40	X	X	X	X

Desempenho produtivo

No início do período experimental e a cada 28 dias todos os animais foram pesados, sem jejum, sendo descontados 4% do peso vivo observado, para assim se obter o peso vivo enxuto. Para a mensuração de peso vivo inicial e final, os animais foram pesados por dois dias consecutivos e os pesos inicial e final formaram a média desses dois dias pesagens.

Antes da primeira e da última pesagem, os animais foram restritos por três dias a consumo equivalente a 2% do peso vivo para se eximir problemas de diferentes pesos ou preenchimento do conteúdo gastrintestinal. A leve restrição alimentar foi feita nos dias -3, -2, e -1, e 92, 93 e 94. As duas pesagens consecutivas foram realizadas nos dias -1 e 0, e 93 e 94 do período experimental, ambas antes da primeira refeição da manhã.

Dessa forma, foi calculado ao final do experimento o ganho de peso diário (GPD) dos animais utilizando-se os dados que foram obtidos nas pesagens inicial e

final. Aliado a isso, foi calculada a conversão alimentar (CA), obtida pela divisão da ingestão de massa seca (IMS) total pelo ganho de peso vivo total durante o experimento. Os animais foram abatidos em frigorífico comercial ao alcançarem média de 5 mm de espessura de gordura subcutânea (EGS).

O rendimento de carcaça foi calculado a partir do peso da carcaça quente, obtido no frigorífico comercial, dividido pelo peso vivo final do animal, obtido no confinamento. A proporção de gordura visceral foi estabelecida pela divisão do peso da gordura presente nos rins e pelve, a qual foi coletada no frigorífico, pelo peso da carcaça quente.

Os animais foram submetidos a avaliações de ultrassonografia no início e no final do período de confinamento segundo a metodologia proposta por Perkins (1992), utilizando-se unidades de ultrassom veterinário “Aloka 500 SSD”, com linear e óleo vegetal como acoplante acústico para verificar a espessura de gordura subcutânea sobre o músculo *Longissimus thoracis* e sobre o músculo *Bíceps femoris* (picanha). Também foi calculado ao final do estudo o ganho diário médio em espessura de ambos os pontos avaliados, por meio da seguinte fórmula: [(medida final (mm) – medida inicial (mm)) / intervalo entre as duas avaliações (dias)]

Incidência de rumenites e abscessos hepáticos

Para avaliação da incidência de rumenites, todos os animais do experimento logo após o abate, tiveram seus rúmens lavados e então analisados. O epitélio ruminal foi classificado conforme a incidência de lesões (rumenites e hiperqueratose) e outras anormalidades no mesmo, numa escala de 0 à 10, seguindo a metodologia descrita por Bigham et al. (1975).

A classificação das papilas ruminais foi feita por duas pessoas treinadas para este fim, sendo o escore final a média dos escores dos dois avaliadores.

Com relação aos abscessos hepáticos, estes seriam classificados de acordo com a incidência e severidade dos mesmos. Essa classificação teve como base o estudo de Brink et al. (1990).

Morfologia, Histologia e Imuno-histoquímica do Epitélio Ruminal

Após o abate, os animais foram eviscerados e os compartimentos rúmen + retículo foram isolados. Após a limpeza, um fragmento de aproximadamente 1 cm² foi coletado da região do saco cranial do rúmen, para análise morfológica, e um fragmento de mesma dimensão foi colhido do recesso do saco ventral do rúmen, para análises de histologia e imunohistoquímica.

As amostras designadas à morfologia foram imediatamente colocadas em frascos contendo solução de tampão fosfato (PBS = 0,79g de NaCl; 0,223g de Na_2HPO_4 ; 0,0524 g de NaH_2PO_4 ; e 100mL de água) a 0,1 M e pH 7,4, e mantidas refrigeradas para a realização das mensurações morfológicas macroscópicas da parede ruminal.

As variáveis morfológicas macroscópicas avaliadas foram: número médio de papilas por cm^2 de parede (NMP), área média das papilas (AMP), área total de superfície absorviva por cm^2 de parede (ASA) e participação das papilas ruminais na área total de superfície absorviva (RPSA). O NMP em todo fragmento foi mensurado por três avaliadores e o dado final foi o valor médio das três contagens. A AMP foi mensurada por meio de imagens digitalizadas das papilas utilizando-se o programa de análise de imagens UTHSCSA Image Tool (RESENDE JÚNIOR et al., 2006).

Em cada fragmento foram analisadas a área média de 12 papilas seccionadas aleatoriamente da base. O dado final para AMP foi a média das 12 papilas. A ASA foi calculada pela seguinte fórmula: $1 + (\text{NMP} \times \text{AMP}) - (\text{NMP} \times 0,002)$, onde o número 1 representa o fragmento de 1 cm^2 coletado, e o 0,002 é a área basal estimada de cada papila ruminal (DANIEL et al., 2006). Finalmente, a RPSA foi calculada como segue: $(\text{NMP} \times \text{AMP} / \text{ASA}) \times 100$.

As amostras coletadas para avaliação histológica foram fixadas por 24 horas em paraformaldeído (LILLIE e FULLMER, 1968). Após o período de fixação, as amostras foram removidas do fixador por uma série crescente de alcoóis.

Após essa etapa, os materiais foram inseridos em soluções de álcool etílico absoluto I, álcool etílico absoluto II, xilol I, xilol II e, após essa etapa, foram mantidos em uma série de parafinas (Histosec®), estando esses em estufas com temperatura em torno de 65°C.

Para a inclusão do material, foram montadas as travas e preenchido de parafina (Histosec®) III. Terminada essa inclusão e passado o período de secagem total dos blocos fabricados, foram feitos cortes desse material, no micrótomo, em secções de 5 μm e caracterizados como cortes definitivos.

A coloração das lâminas contendo os cortes foi efetuada com a inclusão destas em uma sequência de crescente de xilol, corantes e álcoois, para a finalização da confecção das lâminas e posterior análise.

Utilizou-se o Analisador de Imagens Leica Qwin, contido no microscópio eletrônico de luz Leica, para obtenção de imagens de cada corte, captadas por uma micro-câmera para posterior digitalização e mensurações histológicas, sendo elas, altura, largura e área das papilas e espessura do epitélio queratinizado das papilas

ruminais, escolhendo aleatoriamente quatro papilas por animal, sendo o valor final, a média destas.

A altura papilar (em micrômetros) foi definida como sendo a linha reta traçada desde a base ao ápice da papila (Figura 1A).

Para a aferição da largura das papilas, foram traçadas retas em quatro lugares distintos, para que a média fosse considerada (Figura 1B).

Da mesma forma, para se obter a espessura do epitélio queratinizado, foram traçadas retas delimitando tal camada em quatro posições distintas, para que a média fosse estabelecida (Figura 1C).

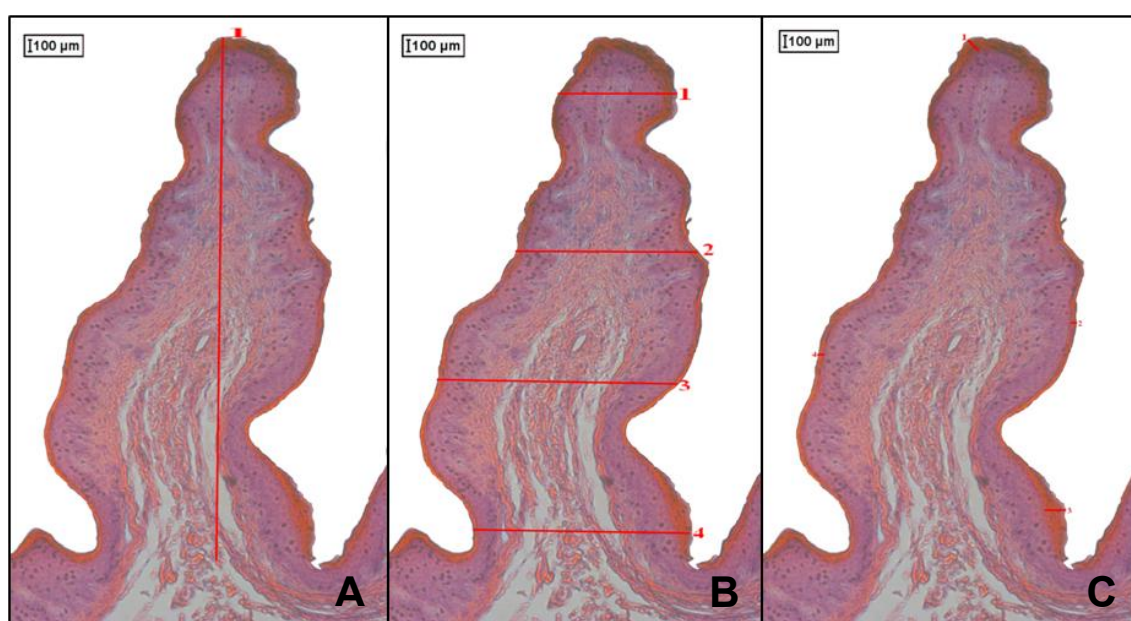


Figura 1. Cortes histológicos longitudinais de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação: A) Exemplificação da metodologia utilizada para aferição da largura das papilas ruminais. B) Exemplificação da metodologia utilizada para aferição da altura do epitélio ruminal. C) Exemplificação da metodologia utilizada para aferição da espessura do epitélio queratinizados das papilas ruminais. Método HE. 5x.

Para determinar a área das papilas, foram delimitadas a área das quatro papilas a fim de se obter a média desta variável (Figura 2).

Para a determinação do IM, foram contados o núcleo de 2.000 células da camada basal do epitélio, contabilizando quantos destes apresentavam figuras mitóticas (Figura 3).

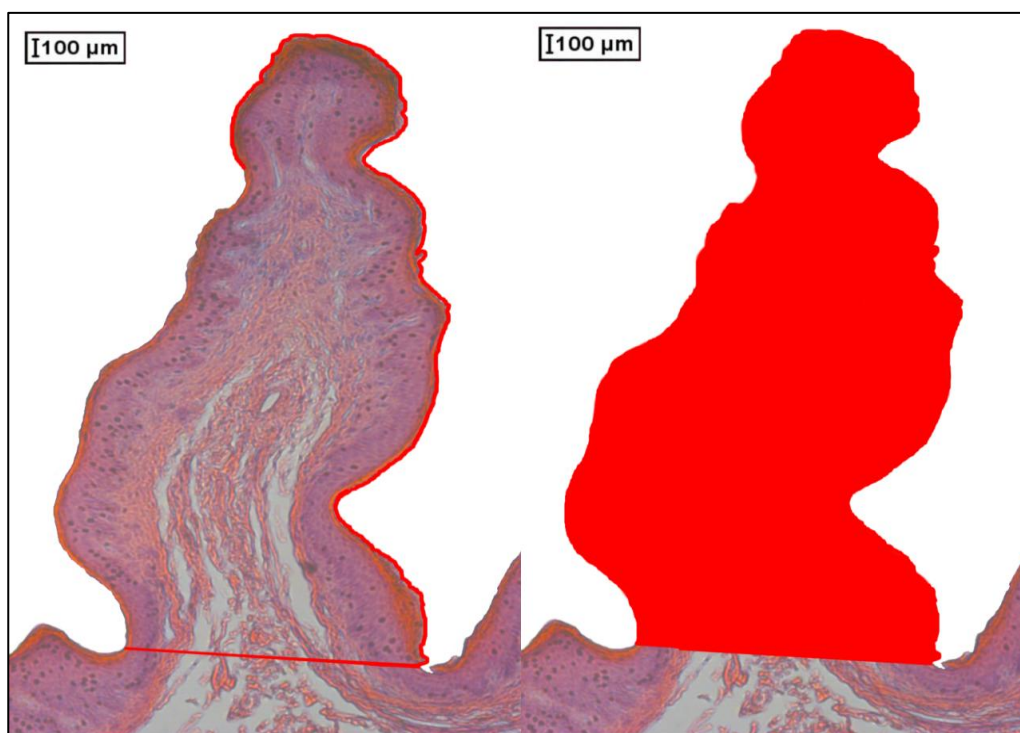


Figura 2. Corte histológico longitudinal de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação, exemplificando a metodologia utilizada para aferição da área papilar. Método HE. 5x.

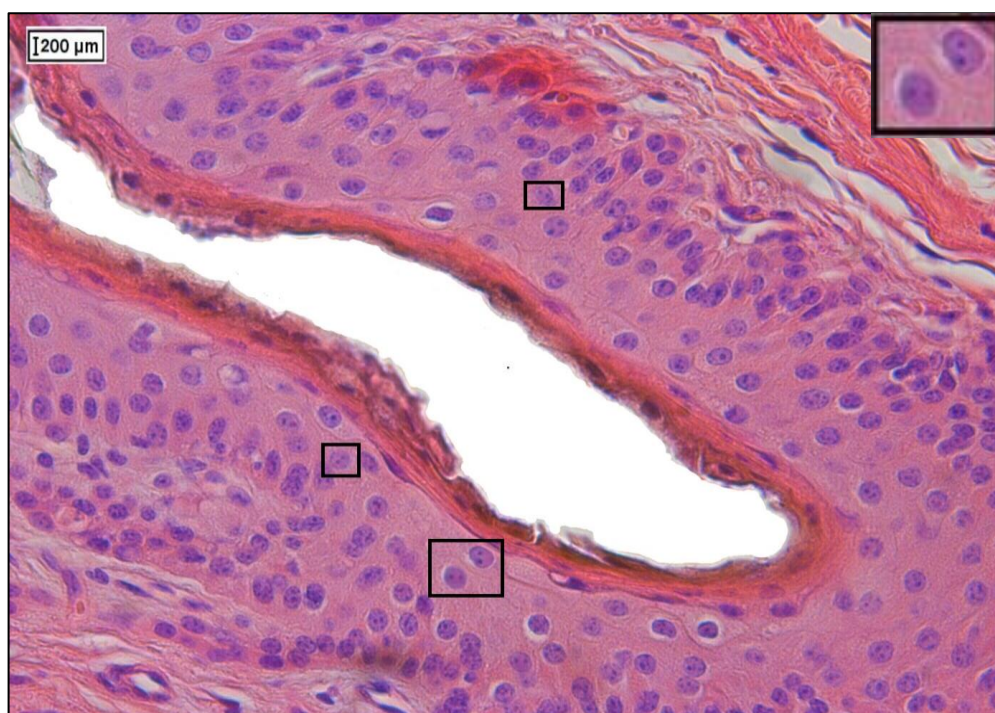


Figura 3. Corte histológico longitudinal de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação, evidenciando núcleos com figuras de mitose. Método HE. 5x.

Assim, o IM foi calculado dividindo-se o número de núcleos com figuras identificação da proliferação e morte celular foi utilizada a técnica de imunohistoquímica que utiliza o Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA, Clone PC10 - DakoCytomation) e o Kit *in Situ* Cell Death Detection, Pod (Roche) respectivamente, adaptada de Pereira et al. (2008).

Em seguida foi feito o desmascaramento do antígeno com tampão citrato, que tem como intuito fazer com que a reação antígeno-anticorpo funcione. Após essa etapa, foi feito o bloqueio da Peroxidase Endógena, em que as lâminas foram tratadas com H₂O₂ 25% diluída em metanol, em local escuro e temperatura ambiente. Logo após foram submetidas a lavagens em PBS (tampão fosfato com pH 7,4). Após estes procedimentos, os protocolos de proliferação e morte celular se diferenciavam da seguinte forma:

Proliferação Celular:

Para a análise de proliferação celular foi feito o bloqueio dos sítios inespecíficos, necessário para que todos os sítios de ligação das células presentes no corte estivessem bloqueados, fazendo com que o anticorpo primário apenas se ligasse no seu antígeno por especificidade.

Em seguida ao bloqueio dos sítios inespecíficos, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário Monoclonal Mouse Anti-Proliferation Celular Nuclear Antigen (Dako) e diluído em PBS juntamente com 3,5% de BSA (Albumina Sérica Bovina) Então, sobre o tecido foram colocados 100µl do anticorpo primário e, assim, as lâminas foram incubadas em câmara úmida “overnight” à temperatura de 4°C.

Após essa etapa as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário (Biotiniled Link-Dako) em câmara úmida e escura em geladeira e depois estas foram incubadas com Streptavidin-HRP (Dako) em câmara úmida e escura em geladeira. Então, foi revelada a reação com DAB (Diaminobenzidina - Dako®) em câmara úmida e escura em temperatura ambiente.

Morte Celular:

Após o bloqueio da Peroxidase Endógena, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído no LABEL SOLUTION. No controle positivo e no negativo foi pipetado apenas o LABEL SOLUTION, sendo colocado 50µl por corte. Estas lâminas com o anticorpo primário foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 1 hora.

Após este período, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário (Enzima POD-converter (HRP) em câmara úmida à 37°C, durante 30 minutos, e assim foi feita a revelação com a DAB (Diaminobenzidina - Dako®) em

câmara úmida e escura. Em temperatura ambiente, foram pipetados 100 μ L por corte durante 3 minutos, onde rapidamente eram lavadas com água destilada.

Nas duas análises citadas, os cortes foram corados com Hematoxilina de Harris, de acordo com a metodologia descrita por Lillie e Fullmer, (1968).

As imagens histológicas dos cortes corados por meio da técnica de imunohistoquímica animal foram isoladas e aleatoriamente cinco papilas foram escolhidas, nas quais foram mensuradas o número de células em proliferação e em morte celular, tanto das papilas quanto da camada basal (Figura 4).

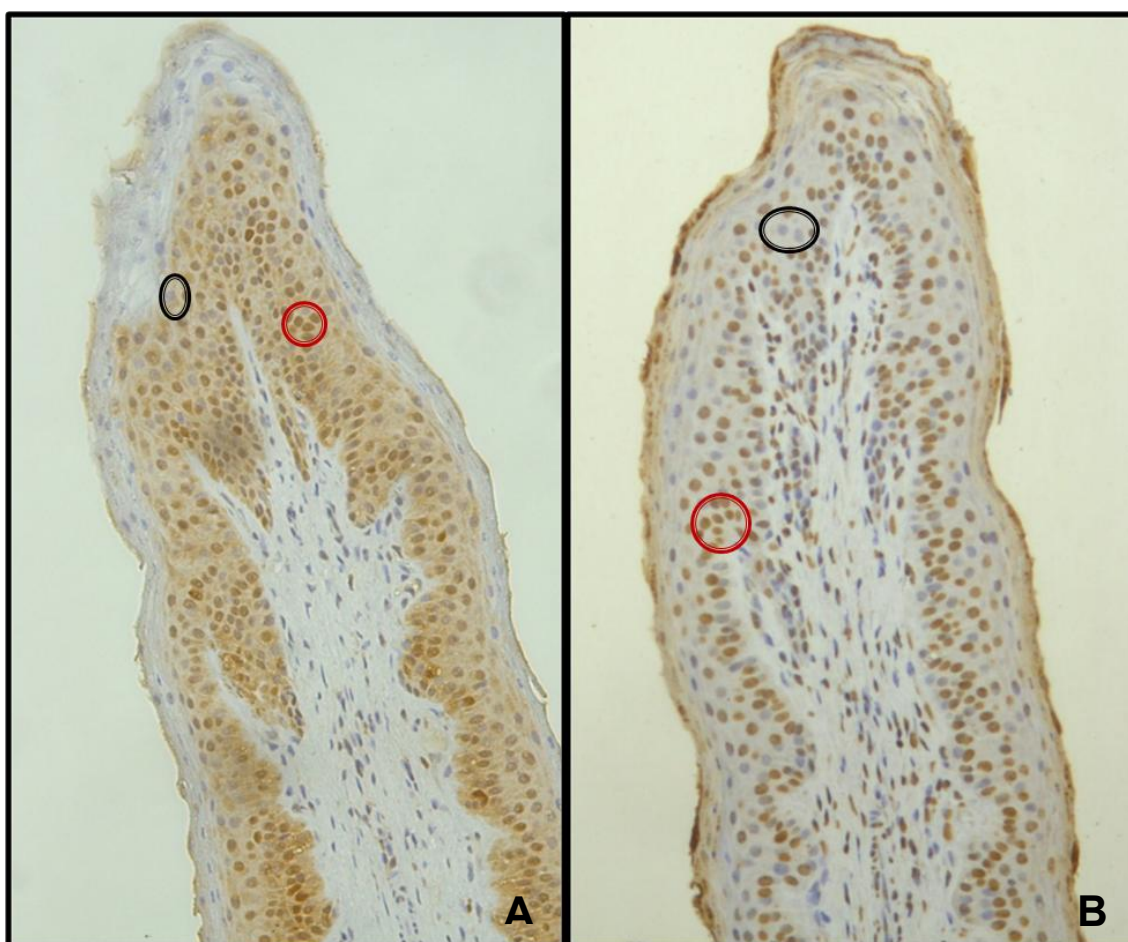


Figura 4. Corte histológico longitudinal de mucosa ruminal de bovinos Nelore terminados em confinamento submetidos a diferentes frequências de alimentação; A) corte representando a técnica utilizada para contabilizar a proliferação celular em papila ruminal. Círculo preto evidenciando núcleo celular e círculo vermelho núcleos em proliferação. B) Corte representando a técnica utilizada para contabilizar a morte celular em papila ruminal. Círculo preto evidenciando núcleo celular e círculo vermelho núcleos em morte celular. Método Imunohistoquímica. 20x.

Assim determinado, foi determinado a relação entre o número médio de núcleos em morte celular, assim como a taxa de proliferação celular.

Avaliação estatística

Os dados foram analisados utilizando-se o PROC MIXED do SAS (2003) de acordo com o modelo abaixo: $Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$; em que: Y_{ij} = observação relativa à j ésima unidade experimental (animal) do i ésimo tratamento; μ = média geral; T_i = efeito do i ésimo tratamento, sendo $i = 1$: um trato/dia, 2: dois tratos/dia, 3: três tratos/dia, 4: quatro tratos/dia; B_j = efeito do bloco; e_{ij} = erro experimental referente à j ésima unidade experimental do i ésimo tratamento ($0; 2\sigma$ e).

Foi realizada uma análise de regressão para avaliação dos dados onde foram testados efeitos linear, quadrático e desvio da quadrática para os tratamentos propostos utilizando-se a opção CONTRAST do SAS (2003).

RESULTADOS

Desempenho produtivo

Com base nos dados mostrados na tabela 3, a frequência alimentar não afetou ($P > 0,10$) o rendimento de carcaça, o consumo de massa seca em quilos ou em porcentagem do peso vivo. Contudo, com o aumento da frequência de alimentação o ganho de peso diário, peso vivo final, a eficiência alimentar e o peso de carcaça quente obtiveram resposta linear ($P < 0,05$), com o aumento da frequência de alimentação.

O peso de carcaça quente também foi afetado ($P = 0,01$) de forma desvio da quadrática, com o aumento da frequência de alimentação (Tabela 3).

Tabela 3. Desempenho e características de carcaça de bovinos Nelore confinados submetidos a diferentes frequências de alimentação.

Item	Tratamentos				EPM	Probabilidade (Valor de P)		
	1x	2x	3x	4x		L	Q	DQ
Desempenho								
Peso Vivo Inicial, kg	356,79	355,63	356,92	357,19	7,89	0,70	0,62	0,59
Peso Vivo Final, kg	449,81	445,43	467,43	463,61	9,51	0,03	0,96	0,07
Ganho de peso diário, kg	0,979	0,961	1,175	1,138	9,51	0,01	0,87	0,08
IMS ¹ , kg	7,75	7,95	8,44	8,10	0,24	0,12	0,22	0,26
IMS, % do peso vivo	1,91	1,98	2,04	1,97	0,04	0,25	0,09	0,55
Conversão alimentar, kg/kg	8,15	8,48	7,16	7,22	0,39	0,02	0,73	0,08
Eficiência alimentar, kg/kg	0,128	0,121	0,141	0,142	0,01	0,03	0,53	0,09
Características de carcaça								
PCQ ² , kg	246,91	242,99	263,07	258,05	5,98	0,01	0,89	0,01
Rendimento de Carcaça, kg	54,97	54,62	56,14	55,58	0,51	0,15	0,84	0,09
Gordura Visceral, kg	3,42	3,43	3,73	3,98	0,34	0,18	0,71	0,82
Gordura visceral, % do PCQ	1,38	1,40	1,41	1,53	0,12	0,37	0,68	0,80
EGS ³ inicial, mm	2,38	2,36	2,45	2,47	0,10	0,41	0,84	0,68
EGS final, mm	5,53	5,58	5,41	5,86	0,26	0,48	0,44	0,47
Ganho diário de EGS, mm	0,034	0,035	0,032	0,037	0,003	0,68	0,48	0,37
EGP8 ⁴ inicial, mm	2,78	2,52	2,79	2,64	0,12	0,75	0,61	0,07
EGP8 final, mm	6,24	6,37	6,31	6,50	0,28	0,57	0,92	0,73
Ganho diário de EGP8, mm	0,038	0,042	0,038	0,042	0,003	0,44	0,91	0,23

¹ Ingestão de Massa Seca. ² Peso de Carcaça Quente. ³ Espessura de Gordura Subcutânea. ⁴ Espessura de Gordura da Picanha. L = Linear. Q = Quadrática. DQ = Desvio da Quadrática

Rumenites e morfologia ruminal

Com relação à morfologia das papilas ruminais, as diferentes frequências de alimentação não influenciaram as variáveis número médio de papilas, área média papilar, área de superfície absorptiva e representatividade das papilas na superfície absorptiva, de acordo com a tabela 4. Da mesma maneira, não houve efeito do aumento da frequência de alimentação sobre o índice de rumenites.

Tabela 4. Médias relacionadas ao número de papilas por cm² de parede ruminal (NMP), área das papilas por cm² (AMP), superfície absorptiva expressa em cm² por cm² de parede (ASA), representatividade das papilas na superfície absorptiva (RPSA) e incidência de rumenites (RUM) de animais submetidos a diferentes frequências de alimentação.

	Tratamentos				EPM	Probabilidade (Valor de P)		
	1	2	3	4		L	Q	DQ
NMP, n	45	43	40	42	3.16	0.42	0.50	0.51
AMP, cm	0.52	0.49	0.47	0.56	0.05	0.67	0.19	0.62
ASA, cm ²	23.09	21.64	20.17	24.61	2.32	0.77	0.21	0.57
RPSA	95.68	95.11	94.67	95.91	0.58	0.92	0.13	0.55
RUM	2.00	1.80	2.20	2.30	0.42	0.49	0.72	0.63

L = Linear. Q = Quadrática. DQ = Desvio da Quadrática

Histologia e Imuno-histoquímica do epitélio ruminal

Para as variáveis histológicas, como altura e área das papilas ruminais, observou-se resposta desvio da quadrática ($P < 0,0001$) em relação ao aumento da frequência de alimentação, em que animais alimentados três vezes ao dia apresentaram maior altura e área de papilas (3,29 mm e 1,29 mm²; respectivamente) que aqueles alimentados uma, duas ou quatro vezes (2,85; 2,79 e 3,14 mm; e 1,11; 1,11 e 1,22mm² respectivamente) (Tabela 5).

Por outro lado, o aumento da frequência de alimentação não afetou ($P > 0,05$) a largura das papilas e nem a espessura da faixa de queratina.

As variáveis células em mitose e índice mitótico foram afetadas de forma linear ($P = 0,047$), com o aumento da frequência de alimentação (Tabela 5).

Em relação à proliferação celular, o aumento da frequência de alimentação acarretou em resposta linear ($P < 0,05$) para células em proliferação e total de células (Tabela 6). No entanto, o aumento da frequência de alimentação não afetou ($P > 0,05$) os índices de proliferação e morte celular.

Tabela 5. Médias relacionadas à altura, largura e área, espessura da faixa de queratina (EFQ), células em células em mitose e índice mitótico (IM) das papilas ruminais de animais submetidos a diferentes frequências de alimentação.

	Tratamentos				EPM	Probabilidade (Valor de P)		
	1	2	3	4		L	Q	DQ
ALTURA, mm	2.85	2.79	3.29	3.14	0.06	<.0001	0.497	<.0001
LARGURA, mm	0.37	0.36	0.34	0.35	0.01	0.065	0.207	0.442
AREA, mm ²	1.11	1.11	1.29	1.22	0.03	0.001	0.250	0.002
EFQ, µm	20.26	19.48	20.37	20.85	0.57	0.299	0.270	0.415
CELULAS EM MITOSE	182.33	211.92	257.00	252.67	28.08	0.047	0.549	0.608
IM (%)	9.12	10.60	12.85	12.63	1.40	0.047	0.549	0.608

L = Linear. Q = Quadrática. DQ = Desvio da Quadrática

Tabela 6. Médias relacionadas à Células em proliferação e em morte, total de células, índice de proliferação e morte celular das papilas ruminais de animais submetidos a diferentes frequências de alimentação.

	Tratamentos				EPM	Probabilidade (Valor de P)		
	1	2	3	4		L	Q	DQ
Proliferação Celular								
Células em proliferação	536,71	799,01	854,07	830,82	106,92	0,0439	0,2008	0,8121
Total de células	753,02	1139,02	1265,47	1184,48	156,48	0,0314	0,1564	0,9492
Índice de proliferação	71,7854	70,1537	68,6898	70,6776	1,7714	0,5484	0,3122	0,6801
Morte Celular								
Células em morte	692,57	770,90	813,41	760,82	136,64	0,6875	0,6341	0,9231
Total de células	1009,90	1096,88	1236,00	1104,28	196,72	0,6334	0,5809	0,7151
Índice de morte	67,8559	69,0654	66,5786	68,4390	1,6607	0,6875	0,6341	0,9231

L = Linear. Q = Quadrática. DQ = Desvio da Quadrática

DISCUSSÃO

De acordo com Mertens (1994), o desempenho animal é determinado pelo consumo de nutrientes, sua digestibilidade e metabolismo. A baixa frequência diária de alimentação para bovinos pode resultar em picos na concentração da maior parte dos metabólitos ruminais, incluindo amônia, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido láctico e do pH (ROBINSON & MCNIVEN, 1994). A alta concentração da maioria dos metabólitos ruminais e a queda do pH reduzem o crescimento e a atividade bacteriana, refletindo em redução da degradação microbiana dos componentes do alimento no rúmen (ORSKOV, 1986).

Com o aumento da frequência alimentar, podemos sugerir que esses picos sejam menos frequentes, resultando em concentração mais constante desses metabólitos e proporcionando, assim, melhor ambiente ruminal e maior eficiência de utilização de alimento pelos bovinos.

Como observado neste estudo, o ganho de peso diário apresentou resposta linear, bem como a conversão alimentar e eficiência alimentar, concordando com os dados expostos por Schwartzkopf-Genswein et al. (2011), que afirmaram que os maiores ganho de peso diário e eficiência alimentar foram influenciados pela maior frequência de alimentação.

Segundo Coleman & Wyatt (1982) e Sniffen & Robinson (1984), o aumento em ganho de peso diário e eficiência alimentar ocorrem quando o aumento da frequência de alimentação promove elevação no consumo, o que também pode estar relacionado a melhor uniformidade nas concentrações de metabólitos ruminais. Ikhatua et al. (1987) atribuíram o maior ganho de peso diário para os animais alimentados com maior frequência aos maiores coeficientes de digestibilidade da MS. No entanto, em estudo aliado a este, Silva et al. (2014) não encontraram efeitos das frequências de alimentação sobre a digestibilidade da matéria seca, do amido e da fibra em detergente neutro (FDN) na fase de terminação. Porém, houve efeitos linear e cúbico sobre a digestibilidade do amido na fase de adaptação, o que favoreceu a digestibilidade deste nutriente em animais alimentados três vezes ao dia, o que poderia explicar a maior ingestão de matéria seca (mesmo que numérica) durante todo o estudo, assim como o maior rendimento de carcaça e melhor conversão alimentar. Aldrigui et al. (2013) também relataram que o ganho de peso de diário foi maior para os animais que se alimentaram mais vezes ao dia.

Alguns autores, consideraram que o aumento no número de refeições tem reflexo positivo no desempenho animal, por melhorar a fermentação ruminal, através da redução das flutuações dos ácidos graxos voláteis, pH e amônia, bem como

elevando a digestão da fibra (KAUFMANN 1976; FRENCH & KENNELLY 1984; ROBINSON & MCNIVEN, 1994).

O maior peso de carcaça quente encontrado para animais alimentados três vezes ao dia, pode ser devido a uma soma dos resultados que favoreceram a fermentação ruminal durante o período experimental, concordando com Gibson (1981), que cita que o desempenho produtivo é favorecido com o aumento da frequência alimentar.

O maior consumo de FDN, observado em estudo paralelo por Silva et al. (2014) na fase de adaptação, além proporcionar um ambiente ruminal mais favorável para uma fermentação equilibrada, pode ainda influenciar na digestibilidade, taxa de passagem e atividade de mastigação e ruminação desse grupo de animais, o que pode afetar o pH ruminal de maneira positiva nesta fase de adaptação ao confinamento, e levando a melhores resultados de desempenho, como observado em animais alimentados três vezes ao dia, os quais apresentaram maiores pesos de carcaça quente.

Os resultados encontrados neste estudo mostram que os animais alimentados três e quatro vezes ao dia destacam-se produtivamente dos animais alimentados uma e duas vezes. Contudo, oferecer a dieta total parcelada em três tratos pode ter proporcionado aos animais adequado intervalo entre as ofertas de alimento, o que provavelmente favoreceu para o restabelecimento do pH ruminal, após a ingestão, à valores não acidóticos, contribuindo para um melhor ambiente ruminal para a classe de bactérias amilolíticas, que produzem propionato.

Segundo Costa et al. (2008), o propionato é o principal responsável pelo desenvolvimento e crescimento das papilas ruminais, resultados estes que concordam com os encontrados nesse estudo, em que os animais alimentados três vezes ao dia, apresentaram maior altura e área das papilas ruminais, devido ao fracionamento da dieta total em três parcelas, aliado ao maior aporte de substrato no rúmen em animais alimentados três vezes ao dia decorrente da maior ingestão de matéria seca (mesmo que numérica) observada resultar em maior fermentação ruminal, e possivelmente aumento na produção de propionato.

Nesta situação, se pode inferir que a maior parte do ATP disponível pôde ser utilizado para o crescimento e multiplicação microbiana e não para sua manutenção, favorecendo a produção de propionato e, conseqüentemente, o desenvolvimento papilar, não somente em altura e área, como também aumentando as variáveis células em mitose e índice mitótico de forma linear, de acordo com o aumento da frequência de alimentação.

Possivelmente, a frequência alimentar de quatro vezes ao dia, por possuir menor intervalo entre os tratos, não permite que o pH ruminal se restabeleça a valores adequados à multiplicação microbiana após a alimentação. Segundo Cooper et al. (1998), o pH ruminal de bovinos alimentados com dietas contendo alto teor de concentrado começa a atingir valores acidóticos em torno de quatro horas após a oferta de alimento.

Desta forma, quando aumentamos a frequência de alimentação para quatro vezes ao dia, no momento em que o animal recebe a dieta, o pH ruminal ainda se encontra em níveis baixos, fazendo com que sua queda seja mais pronunciada, demorando mais tempo para se restabelecer e, assim, proporcionando maior morte bacteriana, menor rendimento microbiano, e consequente diminuição da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), como o propionato, resultando em menor desenvolvimento das papilas ruminais e menor desempenho animal.

O índice mitótico apresentou resposta linear com o aumento da frequência de alimentação. Esta variável pode ser utilizada para expressar a atividade proliferativa do epitélio ruminal (TAMATE e FEEL, 1977). De acordo com Costa et al. (2008), a proliferação celular pode ser afetada pela quantidade de AGCC produzidos. Contudo, neste caso, a maior quantidade de células em mitose observada não atribui ao grupo de animais alimentados três vezes e quatro vezes ao dia melhores resultados e sim resultados normais. Os valores encontrados para o grupo de animais alimentados uma e duas vezes ao dia se mostram menores que o normal, devido a possível fermentação ruminal excessiva destes grupos, com a chegada de maior aporte de energia ao rúmen de uma vez, proporcionando valores de pH mais baixos e consequente morte bacteriana, resultando em menor produção de AGCC, menor desenvolvimento papilar e consequente menor desempenho.

As respostas lineares para células em proliferação e o total de células, juntamente com a resposta linear da quantidade de células em mitose que foram observadas, corroboraram com os valores encontrados para altura e área das papilas ruminais dos animais alimentados três vezes ao dia, que apresentaram maior desenvolvimento destas. Assim, a medida que aumenta a frequência alimentar, ocorre um maior desenvolvimento das papilas ruminais em área e número de células. Porém, o índice de proliferação não apresentou significância, pois papilas maiores apresentam aumento tanto no número de células proliferativas quanto no total de células, equilibrando a porcentagem de células presentes nas papilas e resultando em índices de proliferação mais estáveis para os diferentes tratamentos.

Tais resultados devem ser atribuídos à ingestão de massa seca em paralelo com a conversão alimentar, pois os tratamentos não apresentaram diferenças

significativas para a variável ingestão de massa seca. Porém, quando avaliado a conversão alimentar, a resposta foi linear. Desta forma, quando a quantidade de alimento é fracionada, o aporte de energia é diminuído em cada trato de forma que a fermentação ruminal é contínua e sem oscilações bruscas de pH, fazendo com que haja um equilíbrio entre a produção e absorção de AGCC, favorecendo o ambiente ruminal para que as bactérias tenham maximização na produção microbiana e melhor fermentação ruminal.

Com relação aos índices de proliferação e morte celular, não houve diferença para as diferentes frequências de alimentação, mostrando a capacidade de auto-regulação do ambiente ruminal pelos ruminantes, causando um equilíbrio celular nas papilas ruminais ao final da terminação, em que a frequência de tratos não influenciou nestas variáveis.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados neste estudo, a frequência de alimentação de três vezes ao dia, proporcionou aos animais maiores valores para área e altura das papilas ruminais, bem como maior peso de carcaça quente. Por isso, recomenda-se alimentar bovinos Nelore confinados no mínimo três vezes ao dia.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ALDRIGUI, J. Comportamento ingestivo e temperamento de bovinos nelore : relação com eficiência alimentar e aspectos metodológicos. **Dissertação de Mestrado**. 2013
- BIGHAM, M.L.; MCMANUS, W.R. Whole wheat grain feeding of lambs. Effects of roughage and wheat grain mixtures. **Australian Journal of Agricultural Research**, 1053-1062. 1975.
- BRINK, D.R.; LOWRY, S.R.; STOCK, R.A. et al. Severity of liver abscesses and efficiency of feed utilization of feedlot cattle. **Journal Animal Science**, v.68, p.1201-1207, 1990.
- COLEMAN, S.W. & WYATT, R.D., Cottonseed meal or small grains forages as protein supplements fed at different intervals. **Journal Animal Science**, 11-17. 1982
- COOPER, R.J., KLOPFENSTEIN, T.J.; STOCK, R.A. et al. Effects of imposed feed intake variation on acidosis and performance of finishing steers. **Journal Animal Science**, 1093–1099. 1998.
- COSTA, S.F.; PEREIRA, L.Q.; RESENDE JÚNIOR, J.C. et al. Alterações morfológicas induzidas por butirato, propionato e lactato sobre a mucosa ruminal e a epiderme de bezerros – I Aspectos histológicos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Lavras, MG, v60, n1, p1-9, 2008.
- DANIEL, J.L.P.; RESENDE JÚNIOR, J.C.; CRUZ, F.J. Participação do ruminotriclo e omaso na superfície absorviva total do proventrículo de bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.43, n.5, p.688-694, ec. 2006.
- ESTEVA, D.D.; MILLEN, D.D.; PEREIRA, F.T.V. et al. Proliferação e morte celular do epitélio ruminal de bovinos Nelore confinados submetidos a diferentes protocolos de adaptação. In: XXV Congresso de Iniciação Científica, 2013, Águas de Lindóia. **Anais XXV Congresso de Iniciação Científica**, 2013.
- FOX, D.G.; TEDESCHI, L.O.; TYLUTKI, T.P. et al. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. **Animal Feed Science Technology**, v. 112, p. 29-78, 2004.
- FNPP CONSULTORIA e AGROINFORMATIVOS. **Anualpec**: anuário da pecuária brasileira. São Paulo, 23p. 2013.
- FRENCH, N. e KENNELLY, J.J. The effect of frequency of feeding on rumen parameters and on blood insulin concentrations in dairy cows. **Journal Animal Science**, 1072-1075, 1984.
- GIBSON, J. P. The effects of frequency of feeding on milk production of dairy cattle: In

- analysis of published results. **Animal Production**, v.38, p.181–189, 1981.
- IKHATUA, U.J.; EHOCHÉ, O.W. e UMOH, J.E. The influence of feeding frequency on feed intake, nutrient utilization and nitrogen metabolism in growing zebu cattle. **Journal Agriculture Science**, 639-642. 1987.
- KAUFMANN, W. Influence of the composition of the ration and the feeding frequency on pH regulation in the rumen and on feed intake in ruminants. **Livest Production Science**, 3: 103-114, 1976.
- LILLIE, R.D. e FULLMER, H.M. Histopathologic technique and practical histochemistry. New York. **MacGraw-Hill**, ed. 4, 942p. 1968.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: Forage Quality, Evaluation, and Utilization, Wisconsin. **Proceedings...** Wisconsin: p.450-493. 1994.
- MILLEN, D.D.; PACHECO, R.D.L.; ARRIGONI, M.D.B. et al. Feedlot performance of Nelore and Brangus cattle fed monensin or polyclonal antibody preparation against lactate-producing rumen bacteria. **Journal Animal Science**, v.87, ESuppl.2, p.282, 2009.
- OLIVEIRA, C.A.; MILLEN, D.D. Levantamento sobre as recomendações nutricionais e práticas de manejo adotadas por nutricionistas de bovinos confinados no Brasil: Informações gerais e adaptação. In: REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 48.,2011, Belém do Pará. **Anais...** Belém do Pará: Sociedade Brasileira de zootecnia, [2011]. (CD-ROOM).
- Orskov, E.R. 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal Animal Science**, 63(5):1624-1633.
- PEREIRA, F.T.V. et al. Apoptose e proliferação celular em conceptos bovinos clonados que expressam a Proteína Fluorescente Verde (GFP). In: V Encontro de Zootecnia e IV Simpósio de Ciências da Unesp Dracena SICUD, 2008, Dracena. **Anais** do V Encontro de Zootecnia e IV Simpósio de Ciências da Unesp Dracena SICUD, 2008
- PERKINS, T.L.; GREEN, R.D.; HAMLIN, K.E. Evaluation of ultrasonic estimates of carcass fat thickness and longissimus muscle area in beef cattle. **Journal Animal Science**, v.70, p.1002-1010, 1992.
- PRESTON, R.L. Management of high concentrate diets in feedlot. In: Simpósio sobre Produção Intensiva de Gado de Corte, Campinas. **Anais...**Campinas: CBNA, p.82-91.1998.
- RESTLE, J.; VAZ, F.N. Eficiência e qualidade na produção de carne bovina. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Sociedade Brasileira de Zootecnia. 2003.

- RESTLE, J.; VAZ, F.N.; FEIJÓ, G.L.D. Características de carcaça de bovinos de corte inteiros ou castrados de diferentes composições raciais Charolês x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.5, p.1371-1379, 2000b.
- RESENDE JÚNIOR, J.C.; ALONSO, L.S.; PEREIRA, M.N. et al. Effect of the feeding pattern on rumen wall morphology of cows and sheep. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 526-536, 2006.
- ROBINSON, P.H.; MCNIVEN, M.A. Influence of flame roasting and Feeding frequency of barley on performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.3631-3643, 1994.
- SANTOS, F.A.P.; PEREIRA, E.M.; PEDROSO, A.M. Suplementação energética de bovinos de corte em confinamento. In: Simpósio Sobre Bovinocultura de Corte, 5., 2004. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, p.262-297, 2004
- SAS INSTITUTE. **SAS user's guide**: statistics. release 9.1. Cary, NC, 2003.
- SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K.S.; BEAUCHEMIN, K.A.; GIBB, D.J. et al. Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. **Journal Animal Science**, Savoy, v.81, p.E149-E158, 2003.
- SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K.S.; BEAUCHEMIN, K.A.; Shah, M. A. Relationship between feeding behavior and performance of feedlot steers fed barley-based diets. **Journal Animal Science**, 89:1180-1192, 2011.
- SOTO-NAVARRO, S.A.; KREHBIEL, C.R.; DUFF, G.C. et al. Influence of feed intake fluctuation and frequency of feeding on nutrient of digestion, digesta kinetics, and ruminal fermentation profiles in limit-fed steers. **Journal Animal Science**, **78**:2215–2222. 2000
- Sniffen, C.J. and Robinson, P.H. Nutritional strategy. **Journal Animal Science**, 64: 529-542, 1984.
- STOCK, R.; KLOPFENSTEIN, T.; SHAIN, D. Feed intake variation. In: SYMPOSIUM FEED INTAKE BY FEEDLOT CATTLE, **Proceedings....** Stillwater: Oklahoma State University, 1983. p. 56-59. 1983.
- RESTLE, J.; VAZ, F.N.; FEIJÓ, G.L.D. Características de carcaça de bovinos de corte inteiros ou castrados de diferentes composições raciais Charolês x Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.5, p.1371-1379, 2000b.
- TAMATE, H.; FEEL, B. F. Cell deletion as a factor in the regulation of rumen epithelial populations. **Veterinary Science Communications**, Amsterdam, v1, n. 4, p. 359-364, 1977.