

DEOLINDO STRADIOTTI JÚNIOR

AÇÃO DA PRÓPOLIS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título
de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2002

DEOLINDO STRADIOTTI JÚNIOR

AÇÃO DA PRÓPOLIS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL

Tese apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

APROVADA: 15 de abril de 2002

Prof. Rogério de Paula Lana
(Conselheiro)

Prof. José Carlos Pereira
(Conselheiro)

Prof. Antonio Ricardo Evangelista

Prof^a Célia Alencar de Moraes

Prof. Augusto César de Queiroz
(Orientador)

À minha esposa Cristiana G. P. Stradiotti (Kity).

Aos meus pais, Deolindo Stradiotti (*in memoriam*) e Holanda M. Stradiotti.

Às minhas irmãs Karina e Maria Helena.

Aos Doutores *Onoris causis* Luis Antonio Stradiotti, Pedro Stradiotti e Constantino Fernandes.

A todos os membros da Lista Vital (deficientes físicos com eficiência), nas pessoas dos irmãos camaradas Mônica Vita, Sérgio Milani, Guilherme Armond e Eduardo e Flávia.

Ao amigo e orientador Prof. Augusto César de Queiroz.

Ao amigo e conselheiro Prof. Rogério de Paula Lana.

Ao amigo Prof. Antonio Ricardo Evangelista (primeiro orientador).

Às amigas Maria Celeste Ottomar da Silva e Pollianna de Paula Almeida.

Que todas essas pessoas tenham dentro de si a certeza de minha amizade, respeito e admiração.

AGRADECIMENTO

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização do curso.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa.

Ao Professor e Conselheiro José Carlos Pereira.

À Professora Célia Alencar de Moraes.

Às amigas Poliana M. M. Nunes e Maíra M. L. Camardelli.

Ao amigo José Antonio Freitas, à sua esposa Vilma e ao grande Arthur.

Ao amigo Adriano (Cupim), à sua esposa Deise e seu filho Davi.

À comunidade da Violeira, nas pessoas do Sr. Mingote, Sra. Marieta e seus filhos César e Branco.

Aos colegas de curso e amigos do peito Marcus Vinícius, Eduardo Eifert, Marco Aurélio, Edenio Dettman, Alessandro (Sorocaba), Salete e Juliana.

Aos Professores Sebastião de Campos Valadares, Mário Fonseca Paulino e Maria Ignêz Leão.

Ao Diretor Geral da Faculdade Castelo, Prof. Gilson.

Ao Coordenador de Veterinária da Faculdade Castelo, Prof. Antonio Carlos da S. Bressan.

À família Gomide, nas pessoas dos Professores José Alberto e Carlos Augusto e de suas esposas, respectivamente, Sra. Maria Lúcia e Ester.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

DEOLINDO STRADIOTTI JÚNIOR, filho de Deolindo Stradiotti e Holanda M. Stradiotti, nasceu em 16 de maio de 1964, em Igarapu – SP.

Em 1991, concluiu o curso de Zootecnia na Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras-MG.

Em março de 1992, iniciou o curso de Mestrado em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa-MG, concentrando seus estudos na área de Forragicultura e Pastagens, concluindo-o em 28 de fevereiro de 1994.

Em março de 1994, iniciou o Programa de Doutorado em Zootecnia, na UFLA, concentrando seus estudos na área de Forragicultura e Pastagens, tendo, em dezembro de 1995, pedido afastamento especial (acidente automobilístico).

Em março de 2000, deu continuidade ao seu Programa de Doutorado em Zootecnia na UFV, direcionando seus estudos para a área de Nutrição de Ruminantes, defendendo tese em abril de 2002.

Encontra-se sediado no IESES (Instituto de Ensino Superior do Espírito Santo-Faculdade Castelo) como Professor de Nutrição Animal.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Os ruminantes e suas particularidades digestivas.....	3
1.2. Manipulação da fermentação ruminal.....	4
1.3. Bactérias gram-positivas e suas relações com as fermentações indesejáveis no rúmen.....	5
1.4. Os antibióticos e a inibição das bactérias gram-positivas no rúmen.	6
1.5. Relatos de desempenho animal com o ionóforo monensina.....	8
1.6. A própolis.....	11
1.7. Relatos da atividade antibacteriana da própolis.....	13
1.8. A própolis como alternativa de manipulação da fermentação ruminal	14
1.9. Relatos de desempenho animal com a própolis	15
2. LITERATURA CITADA	16
Ação da Própolis sobre a Desaminação de Aminoácidos e a Fermentação Ruminal.....	23
Resumo.....	23
Abstract.....	24
Introdução.....	25
Material e Métodos.....	27

Resultados e Discussão.....	33
Conclusões.....	37
Literatura Citada.....	38
Ação do Extrato de Própolis sobre a Fermentação <i>in vitro</i> de Diferentes Alimentos pela Técnica de Produção de Gases	41
Resumo.....	41
Abstract.....	42
Introdução.....	43
Material e Métodos	44
Resultados e Discussão.....	47
Conclusões.....	52
Literatura Citada.....	53
Ação da Própolis e da Monensina sobre o Consumo de Matéria Seca e a Fermentação Ruminal em Caprinos.....	55
Resumo.....	55
Abstract.....	56
Introdução.....	57
Material e Métodos.....	57
Resultados e Discussão.....	60
Conclusões.....	65
Literatura Citada.....	66
3. RESUMO E CONCLUSÕES.....	68

RESUMO

STRADIOTTI JR., Deolindo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002.
Ação da própolis sobre a fermentação ruminal. Orientador: Augusto César de Queiroz. Conselheiros: Rogério de Paula Lana e José Carlos Pereira.

A tese compõe-se de três capítulos. O primeiro versa sobre a ação da própolis *in vitro* na atividade específica de produção de amônia (AEPA) ou atividade de desaminação de aminoácidos e na fermentação ruminal em bovinos. A AEPA foi determinada utilizando-se líquido ruminal e tampão de McDougall (1:4) contendo diferentes níveis de extrato de própolis e excesso de caseína hidrolisada. No estudo da ação da própolis *in vivo* sobre a fermentação ruminal e AEPA, foram utilizados quatro novilhos Holandeses, em dois períodos experimentais, alimentados com dieta contendo 35% de concentrado, submetidos aos tratamentos controle e com extrato de própolis. O extrato de própolis obtido com etanol a 70% em água foi mais eficiente *in vitro* que a 99,5%, obtendo-se valores de até 78% de inibição da AEPA em relação ao controle. O extrato de própolis não afetou o consumo de matéria seca, o pH, as concentrações de amônia e de proteína microbiana e as proporções molares dos ácidos graxos voláteis (AGV), acético, propiônico e butírico no líquido de rúmen. Entretanto, o extrato de própolis aumentou a concentração de AGV totais e

inibiu a AEPA pelos microrganismos ruminais, indicando que, apesar de não ter reduzido o nível ruminal de amônia, existe o potencial deste efeito ocorrer em outras situações, como em dietas contendo alta taxa de proteína degradável/carboidrato fermentescível, observado em pastagens novas de gramíneas ou pastagens de gramíneas consorciadas com leguminosas. No segundo capítulo, procurou-se avaliar a ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. Dois experimentos foram realizados. No primeiro experimento, incubaram-se 100 mg de matéria seca de feno de brachiária moído, em ausência (0,2 mL de solução alcoólica a 70% em água) ou presença de 0,2 mL de extrato de própolis (extração de 3 g de própolis em pedra triturada para cada 10 mL de álcool a 70%, durante dez dias, posteriormente diluída para 50% da mesma). O extrato de própolis, quando comparado ao tratamento controle, reduziu a produção final total e a produção final de gases para carboidratos fibrosos. A taxa de digestão específica para carboidratos fibrosos e carboidratos não-fibrosos foi superior quando se utilizou o extrato de própolis. A redução da produção total de gases pode ser atribuída ao efeito da própolis em aumentar a concentração molar de propionato, com conseqüente diminuição da relação acetato:propionato. No segundo experimento, procurou-se avaliar diferentes diluições de extrato de própolis (0; 13,7; 33,3; e 66,7%), em analogia à monensina sódica, adicionada para atingir 5,0 μ M como concentração final nos tubos de incubação. Observou-se efeito significativo de tratamento, alimento e interação alimento:tratamento sobre o volume de gás proveniente dos carboidratos fibrosos e não-fibrosos. Não houve efeito do menor nível de própolis (13,7%) sobre nenhuma das dietas avaliadas, para volume final de gases oriundos tanto dos carboidratos fibrosos quanto não-fibrosos. Entretanto, o maior nível (66,7%) mostrou-se eficiente diante de todas as dietas, para ambos os carboidratos, inclusive suplantando a monensina na maioria das vezes, quanto à menor produção final de gases. Avaliou-se, no terceiro capítulo, a ação da própolis *in vivo* sobre o consumo, a fermentação ruminal e atividade específica de produção de amônia (AEPA) em seis cabras estabuladas. Esses animais, fistulados no rúmen,

foram submetidos a uma dieta contendo 67% de silagem de milho e 33% de concentrado, fornecida *ad libitum*, três vezes ao dia (8, 12 e 16 h). Testaram-se níveis semanais crescentes de própolis (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 gramas de própolis/cabeça/dia), advindos da própolis bruta ou do extrato alcoólico a 70% em água. Para compor um terceiro tratamento, utilizaram-se níveis crescentes de monensina na forma de Rumensin® (0, 11, 22, 33, 44 e 55 mg de monensina/kg de matéria seca consumida). Os tratamentos com a presença de própolis e monensina não afetaram o consumo de matéria seca, o pH e a amônia ruminais. Entretanto, embora não-significativa, houve redução de 21,1 e 12,2% no consumo de matéria seca, respectivamente, para monensina e própolis bruta. Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a AEPA. Observou-se, no entanto, tendência de o extrato de própolis suplantar a monensina em potencialidade para inibir a AEPA (19,7% mais eficiente) pelos microrganismos ruminais. Os tratamentos com própolis e monensina não afetaram ($P>0,05$) os teores dos ácidos acético, propiônico e butírico no total de ácidos graxos no líquido ruminal. Entretanto, foi possível evidenciar redução do teor de acetato (14,6%) e aumento do propionato (44,53%), pelo uso da monensina em relação ao tratamento controle, e acréscimo do teor de propionato (24,8%), pelo uso da própolis bruta. De modo geral, a falta de efeito estatístico foi devida à limitação do número de animais.

ABSTRACT

STRADIOTTI JR., Deolindo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, April 2002.
Effect of the propolis on the ruminal fermentation. Adviser: Augusto César de Queiroz. Committee members: Rogério de Paula Lana and José Carlos Pereira.

The thesis is composed by three chapters. The first turns about the In vitro effect of the propolis on the specific activity of ammonia production (SAAP) or activity deamination of amino acids and on the ruminal fermentation in bovine. The specific activity of ammonia production was determined using ruminal fluid and McDougall buffer (1:4) with different levels of propolis extract and excess of hydrolyzed casein. In the study of the in vivo effect of the propolis on the ruminal fermentation and SAAP, four Holstein steers were used, in two experimental periods, fed diet with 35.0% of concentrate and submitted to the control and propolis extract treatments. The propolis extract obtained with ethanol at 70% in water was In vitro more efficient than that obtained with ethanol at 99.5% in water. Values up to 78% of inhibition of SAAP in relation to the control were obtained. The propolis extract did not affect the dry matter intake, the pH, the ammonia concentrations and

of microbial protein and the molar proportions of the volatile fat acid (VFA), acetic, propionic and butyric in the rumen fluid. However, the propolis extract increased the total VFA concentration and it inhibited SAAP by the ruminal microorganisms, demonstrating that, in spite of not having reduced the ruminal ammonia level, exists the potential of this effect to happen in another situations, as in diets with high rate of degradable protein /fermentable carbohydrate, observed in new grass pastures or grass pastures consociated with legumes. In the second chapter, the objective was to evaluate the effects of the propolis extract on the in vitro fermentation of different feeds by the technique of gas productions. Two experiments were accomplished. In the first experiment, 100 mg of ground brachiaria dry matter hay was incubated, in absence (0.2 mL of alcoholic solution at 70,0% in water) or presence of 0.2 mL of propolis extract (extraction of 3 g of propolis in triturated stone for each 10 mL of alcohol at 70%, for ten days, later on diluted for 50% of the same). The propolis extract, when compared to the control treatment, reduced the final total production and the final gas productions for fiber carbohydrates. The specific digestion rate for fiber carbohydrates and non fiber carbohydrates was superior when the propolis extract was used. The reduction of the total gas productions could be attributed to the effect of the propolis in increasing the molar propionate concentration, with consequent decrease of the acetate:propionate ratio. In the experiment 2, the objective was to evaluate different dilutions of the propolis extract (0.0; 13.7; 33.,3; and 66.7%), in analogy to the sodium monensin, added to reach 5,0 M as a final concentration in the incubation tubes. It was observed significant effect of treatment, feed and feed:treatment interaction on the gas volume from the fiber and non fiber carbohydrates. There was not effect of the smallest propolis level (13.7%) on none of the evaluated diets, for final gas volume as for the fiber as non fiber carbohydrate. However, the highest level (66.7%) shown efficient before all the diets, for both carbohydrates, besides supplanting the monensin most of the time with relation to the smallest final gas production. In the third chapter, the effect of the propolis on the In vivo dry matter intake, the ruminal fermentation and SAAP using six confined

goats was evaluated. Those animals, rumen fistulated, was submitted to a diet with 67.0% corn silage and 33.0% of concentrate, ad libitum fed, three times a day (8, 12 and 16 hours). Crescent weekly levels of propolis were tested (0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; and 8.0 grams of propolis/head.day), from the crude propolis or from the ethanol extract at 70% in water. To compose a third treatment, crescent levels of monensin were used in the form of Rumensin® (0, 11, 22, 33, 44 and 55mg of monensin/kg of dry matter intake). The treatments with the propolis and monensin did not affect the dry matter intake, the pH and the ruminal ammonia concentration. However, although not significant, there was reduction of 21.1 and 12.2% in the dry matter intake, respectively, for monensin and crude propolis. There was not significant effect of the treatments on SAAP. It was observed, however, tendency of the propolis extract in supplanting the monensin in potentiality inhibit SAAP (19.7% more efficient) by the microorganisms. The treatments with propolis and monensin did not affect the contents of the acetic, propionic and butyric acids in the total of the volatile fat acids in the ruminal fluid. However, it was possible to evidence reduction of the acetate (14,6%) and increase of the propionate (44,53%) concentrations by the use of monensin in relation to the control treatment and increase of the propionate concentration (24.8%) by the use of the crude propolis. In general, the lack of statistical effect was due to the limitation of the number of animals.

1. INTRODUÇÃO

O sistema agropecuário brasileiro vem experimentando um amplo processo de transformações causadas, entre outros fatores, pelas pressões competitivas provenientes da abertura de mercado e do aumento das exigências dos consumidores em relação à qualidade dos produtos. Essas transformações demandam uma intensificação nos sistemas de produção de carne para aumentar a produtividade e obter carne com bom padrão de qualidade e, conseqüentemente, elevar a rentabilidade das propriedades. O uso de aditivos alimentares é uma forma de que o nutricionista dispõe para incrementar a produção animal, via modificações benéficas da fermentação ruminal, com conseqüente melhoria da eficiência alimentar dos animais.

Com o uso de antibióticos ionóforos, grupo de aditivos muito utilizado em determinados países, extraídos da fermentação de várias espécies de *Streptomyces*, a maior eficiência alimentar pode decorrer da menor ingestão de alimentos e mesmo do ganho de peso para animais ruminantes confinados ou da mesma ingestão com maiores ganhos, quando esses animais se encontram em pastejo (Goodrich et al., 1984; Moraes et al., 1993). Estes aditivos agem melhorando a qualidade ou a quantidade de nutrientes disponíveis para absorção pelo trato gastrointestinal.

Estudos têm registrado que essas alterações no comportamento alimentar de ruminantes, atuando de forma direta na ingestão de matéria seca, pelo uso de ionóforos, ocorrem via alterações na digestibilidade dos alimentos, na produção de ácidos graxos, na utilização da proteína, na produção de gases, no enchimento e na taxa de passagem dos alimentos pelo rúmen (Schelling, 1984). Ocorre que o principal mecanismo de ação dos ionóforos, para melhorar a eficiência alimentar nos ruminantes, está relacionado a mudanças na população microbiana do rúmen, selecionando as bactérias gram-negativas, produtoras de ácido propiônico, mais resistentes, inibindo as gram-positivas – responsáveis pela desaminação de aminoácidos – e, segundo Henderson et al. (1981) e McCaughey et al. (1997), inibindo as produtoras de ácidos acético, butírico e láctico, H₂ e metano. A primeira categoria geralmente é mais resistente aos ionóforos que as gram-positivas, porque apresenta na sua constituição uma membrana externa de proteção (Russel & Strobel, 1989). Tal mecanismo foi proposto por Russell (1987), ao estudar a ação do ionóforo monensina sobre o *Streptococcus bovis*, bactéria gram-positiva produtora de ácido láctico, e observar que esta era sensível à droga, tendo o seu crescimento inibido, devido à característica morfológica de sua parede celular (não possui uma membrana externa), permitindo, com isto, a ocorrência de troca iônica, provocada pelo ionóforo que aumenta o fluxo de cátions através de sua membrana e altera todo o equilíbrio energético celular. Logo, a ação antibiótica é devida ao decréscimo de gradiente de prótons intra e extracelular, que resulta na redução da força próton-motriz que é uma das fontes de adenosina trifosfato (ATP) para a bactéria. Adicionalmente, a bactéria consome ATP para reverter o sistema ATP-ase e eliminar o excesso de prótons intracelular causado pelos ionóforos. Devido à maior concentração iônica (cátions) dentro da célula, ocorre aumento da pressão osmótica, a água penetra em excesso e, com isso, a célula “incha”, tendendo a romper-se (Barragry, 1994).

Segundo Mirzoeva et al. (1997), a própolis e alguns de seus componentes também possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que,

segundo esses autores, a caracteriza como substância ionófora. Este efeito bactericida da própolis, dependente da espécie bacteriana em questão, apresenta-se efetivo justamente sobre bactérias gram-positivas (Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Park et al., 1997).

Por tratar-se de substância natural e em razão de sua aplicação ser efetiva como aditivo para a nutrição de ruminantes, a própolis agregaria aos produtos animais resultantes de seu uso o diferencial de qualidade, vindo a fortalecer a aceitação e comercialização desses produtos. Como possível agente ionóforo, estaria ainda, de forma indireta, reduzindo a poluição ambiental, pela redução das perdas por fermentação (metano e amônia).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar, de forma analógica, a eficiência do ionóforo monensina e da própolis em promover alterações benéficas sobre a fermentação ruminal.

1.1. Os ruminantes e suas particularidades digestivas

Os ruminantes são considerados animais “gastricamente evoluídos”, por conterem um estômago com quatro compartimentos, em que o primeiro destes compartimentos – o rúmen – é o responsável por esta classificação. Ocorre que a existência do rúmen permite a ingestão e digestão parcial de carboidratos estruturais, principalmente da celulose, material abundante na face da terra, porém sem utilização direta pelo homem e outros mamíferos. Esta digestão diferenciada explica-se pela presença, no rúmen, de uma microbiota constituída de bactérias, protozoários e fungos que convivem em simbiose no animal.

Entre os microrganismos presentes, as bactérias desempenham papel fundamental na digestão dos alimentos ingeridos pelo animal, pois através de fermentação ruminal dos carboidratos produzem ácidos graxos voláteis, principal fonte de energia para os ruminantes. Esses microrganismos produzem energia também por intermédio da hidrólise e desaminação de proteínas e da hidrólise de

lipídios. Ainda, sintetizam aminoácidos e vitaminas, essenciais ao animal hospedeiro.

Potencializar essa simbiose por meio de manipulações ruminais, objetivando obter melhor desempenho animal, é uma das principais tarefas do nutricionista de ruminantes.

1.2. Manipulação da fermentação ruminal

Um dos caminhos encontrados para melhorar o desempenho animal, por intermédio da manipulação dos microrganismos, é inibir o crescimento de bactérias gram-positivas responsáveis por alguns processos de fermentação ruminal considerados ineficientes ou mesmo prejudiciais. Dentre esses processos que devem ser minimizados, incluem-se a degradação da proteína do alimento, a absorção cíclica da amônia e a produção de metano (Nagaraja et al., 1997). Sabe-se que a desaminação dos aminoácidos da proteína causa acúmulo de amônia no rúmen, absorção cíclica desta amônia e conseqüente aumento da excreção de uréia através da urina, ocasionando perda energética (gastam-se três ATP por mol de uréia excretada) e diminuição da eficiência de utilização do nitrogênio alimentar. É importante que a maior parte da proteína, na forma de proteína verdadeira (que não seja nitrogênio não protéico), uma vez ingerida, escape à digestão no rúmen, em virtude do ataque dos microrganismos, e seja aproveitada pelo último saco gástrico (abomaso), onde ocorre a digestão enzimática do alimento. O escape dessa proteína verdadeira ao ataque de microrganismos tem dupla finalidade: diminuir os custos de produção pelo aumento da eficiência do uso do nutriente mais caro da alimentação desses animais (a proteína) e, como conseqüência da primeira finalidade, reduzir a contaminação do solo e cursos d'água e das plantas pela diminuição da excreção de uréia na urina dos animais.

A inibição dessas bactérias gram-positivas causa outro efeito benéfico, tanto ao desempenho do animal quanto à poluição ambiental, que é a diminuição da

produção de metano (gás responsável pela destruição da camada de ozônio). Segundo Lana et al. (1998), a produção de gás metano pelas bactérias ruminais e intestinais pode corresponder a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido. Com relação à poluição ambiental, deve-se considerar o fato de que um bovino adulto chega a produzir mais de 400 litros de gás por dia (metano + dióxido de carbono), liberado no meio, principalmente por eructação. Considerando que, hoje, o rebanho bovino mundial é de mais de 1 bilhão de cabeças (ANUALPEC, 2001), Madigan et al. (1997) alertaram para o fato de os ruminantes serem os animais que mais contribuem para a emissão de metano na atmosfera, na proporção de 27%.

Procura-se ainda, por intermédio de manipulação da fermentação ruminal, minimizar a produção de ácido láctico, quando os animais recebem dietas com altos níveis de concentrados, reduzindo-se, assim, a possibilidade de acidose láctica.

1.3. Bactérias gram-positivas e suas relações com as fermentações indesejáveis no rúmen

A capacidade ruminal de degradar proteínas (proteólise) e produzir amônia (desaminação) e de produzir gás metano e ácido láctico, em sua maior parte, é dependente da presença de bactérias gram-positivas no ambiente ruminal. Exemplos dessas bactérias são: *Clostridium sticklandii* (linhagem SR) *Peptostreptococcus anaerobius* (estirpe C) e *Clostridium aminophilum* (estirpe F), desaminadoras; *Prevotella ruminicola*, *Megasphaera elsdenii* e *Selenomonas ruminantium*, proteolíticas; *Methanobrevibacter ruminantium*, *Methanobacterium formicicum* e *Methanomicrobium mobile*, metanogênicas; e *Streptococcus bovis* e *Lactobacillus spp*, produtoras de ácido láctico. Artíficos ou produtos que venham a inibir o crescimento dessas bactérias possibilitariam alcançar os benefícios tanto em produtividade animal quanto em qualidade ambiental, já mencionados.

1.4. Os antibióticos e a inibição das bactérias gram-positivas no rúmen

Entre as alternativas para manipular as condições no rúmen, com vistas a controlar a atividade e o crescimento das bactérias gram-positivas, a utilização de antibióticos ionóforos, principalmente monensina e lasalocida, tem se mostrado eficiente. Estes inibem as bactérias gram-positivas, uma vez que a resistência está relacionada com a presença de uma membrana externa, de natureza lipopolissacarídica, existente somente em bactérias gram-negativas (Russell & Strobel, 1988). A inibição se dá pela catálise das trocas de sódio e prótons ou prótons e potássio na membrana (Pressman, 1976).

Segundo Bergen & Bates (1984), os efeitos benéficos dos ionóforos na fermentação ruminal são o aumento na produção de propionato, com conseqüente redução na de metano, resultando em melhoria na eficiência energética, a diminuição na degradação protéica, resultando em melhoria na utilização dos compostos nitrogenados, e a reduzida produção de ácido láctico, que acarreta diminuição nas desordens ruminais.

Existem mais de 70 tipos de ionóforos, mas somente a monensina e a lasalocida foram liberadas para a alimentação animal. Esses dois antibióticos ionóforos (encontrados com o nome comercial de Rumensin[®] e Taurotec[®] ou Bovatec[®], respectivamente) têm sido avaliados, em diversos ensaios, quanto a sua eficiência em alterar benéficamente a fermentação ruminal (Nagaraja et al., 1982; Chen & Russell, 1991; Yang & Russell, 1993a; Yang & Russell, 1993b; Lana & Russell, 1997) e quanto aos seus efeitos sobre o desempenho dos animais, tanto a pasto (Rode et al., 1994; Andrade et al., 1996; Parrot et al., 1990) quanto em confinamento (Boin et al., 1984; Moraes et al., 1993; Branco et al., 1996). Embora em menor número, as pesquisas que buscam avaliar os efeitos da monensina sobre a produção e composição do leite têm sido realizadas (Randell & Rouquette, 1976; Lemenager et al., 1978; Sprott et al., 1981; Brown & Hogue, 1985).

O efeito da monensina na inibição da produção ruminal de amônia foi inicialmente observado por Dinius et al. (1976). Resultados de trabalhos *in vitro* têm demonstrado diminuição na produção de amônia pela população microbiana, variando de 33 a 36%, quando incubada em um meio contendo 15 g/L de caseína hidrolisada (Chen & Russell, 1991; Yang & Russell, 1993a). Em experimentos com animais, essa redução variou de 28 a 54% (Yang & Russell, 1993b; Lana & Russell, 1997). Por sua vez, a atividade específica de produção de amônia (AEPA), nesses dois últimos experimentos, reduziu de 18 a 38%.

Segundo Russell (1996), a monensina inibe o crescimento da bactéria gram-positiva *Streptococcus bovis*, que está relacionada com acidose aguda no rúmen, sendo que as utilizadoras de lactato são resistentes (Russell & Strobel, 1988). Nagaraja et al. (1997) consideram a *Streptococcus bovis* e a *Lactobacillus spp* – principais produtoras de ácido lático no rúmen – sensíveis à monensina. Esta substância inibe ainda as bactérias produtoras de hidrogênio, formato, acetato, butirato, enquanto as produtoras de succinato e propionato são resistentes (Russell & Strobel, 1989). O aumento na produção de propionato é acompanhado pela redução na quantidade de metano produzida. Considerando que os antibióticos ionóforos não são inibidores das bactérias metanogênicas (Chen & Wolin, 1979, citados por Nagaraja et al., 1997), a diminuição na metanogênese pode ser atribuída à redução nos precursores (H₂ e formato).

Embora a forma de ação, no rúmen, desses principais antibióticos ionóforos esteja elucidada, a literatura apresenta-se escassa de trabalhos relacionados ao metabolismo e à concentração desses antibióticos em outros tecidos e órgãos, razão pela qual alguns mercados têm se mostrado receosos ao consumo de produtos de origem animal oriundos de animais alimentados com essas substâncias.

1.5. Relatos de desempenho animal com o ionóforo monensina

A *performance* de aproximadamente 16.000 bovinos de corte confinados nos Estados Unidos foi documentada por Goodrich et al. (1984), em ensaios com a monensina em concentrações que variaram de 24,3 a 39,3 mg de monensina/kg de matéria seca consumida. Concluiu-se que os menores níveis de uso foram mais eficientes em promover melhorias na conversão alimentar desses animais recebendo rações com altas concentrações energéticas. A conversão foi, em média, 7,5% melhor em rações com 2,9 Mcal de energia metabolizável/kg de matéria seca consumida. Os diversos parâmetros de características de carcaça estudados não apresentaram significância estatística. Ainda na comparação produtiva entre machos e fêmeas de bovinos, não se observaram diferenças significativas quanto à conversão alimentar e ao ganho de peso, com o uso da monensina.

Moss (1994), revisando 25 experimentos com animais confinados, mostrou que o uso da monensina reduziu o consumo na ordem de 5 a 6%, com melhoria da conversão variando de 5 a 8%. O mesmo autor sumarizou 12 experimentos com dietas compostas por alta forragem e observou que a conversão alimentar dos animais recebendo monensina foi 9% melhor, com um consumo, em média, 3% inferior, e o ganho de peso dos animais foi 14% superior. Já em pastagens (12 experimentos), o ganho de peso de animais suplementados com monensina foi 17 pontos percentuais maior que o de não-suplementados.

Nagaraja et al. (1997), resumindo 35 experimentos conduzidos na Europa, relataram melhoria de 9% na conversão alimentar de bovinos, com redução de 4% no consumo de matéria seca e aumento de 5% no ganho de peso.

No Brasil, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos para determinar a eficiência da monensina no desempenho animal. Os trabalhos com animais confinados têm sido conduzidos utilizando-se dietas com alta concentração de volumoso (50 a 65%), de forma que, por questões econômicas, a ração concentrada não atenda mais que 1% do peso vivo animal.

Boin et al. (1984), ao adicionarem 125 mg de monensina/dia a dietas contendo volumoso à vontade e 4,2 kg de concentrado, observaram redução média de 5% no consumo de matéria seca de 45 animais nelore inteiros em confinamento e conversão alimentar 8,4% melhor. Valor semelhante de melhoria na conversão alimentar (8,08%) foi observado por Moraes et al. (1993a), ao utilizarem, em terminação, 40 machos $\frac{3}{4}$ Gir-Holandês recebendo 58% de volumoso e suplementados com 200 mg de monensina/animal/dia.

Trabalhando com bezerros holandeses não-castrados com peso vivo médio de 90,8 kg, Salles et al. (2000) verificaram efeito benéfico da adição de monensina sobre algumas características produtivas. Segundo os autores, houve melhora no desempenho dos animais, mostrando aumentos no ganho de peso, proporcionando ainda melhor retorno econômico, quando comparado ao tratamento sem monensina.

Valadares Filho (2000) considera o uso da monensina diretamente dependente de prévia análise de sua relação benefício/custo no sistema de produção, uma vez que tem ocorrido melhora, invariável ao longo do tempo, de 7% na conversão alimentar, independentemente dos efeitos no ganho de peso ou no consumo de matéria seca.

Estudos em território brasileiro visando avaliar as características de carcaça de bovinos suplementados com monensina sódica também foram realizados por diversos autores. Moraes et al. (1993b,c), trabalhando com bovinos machos adultos, Restle et al. (2000a), com vacas de descarte, e Alves Filho et al. (2000), com novilhas de descarte, não observaram significância nos resultados de características quantitativas e qualitativas da carcaça. Entretanto, Restle et al. (2000b) observaram que, embora a inclusão de monensina sódica à dieta alimentar de novilhas de corte da raça Charolesa não tenha alterado as características organolépticas, a composição física da carcaça e as características sensoriais da carne, os animais que não foram suplementados com monensina apresentaram maturidade fisiológica menos avançada, ou seja, apresentaram menor grau de ossificação das cartilagens dos processos espinhosos das vértebras torácicas, lombares e entre as vértebras sacrais.

Já Salles & Lucci (1998), trabalhando com uma categoria de animais mais jovens (bezerros na fase de crescimento) recebendo suplementação de monensina sódica na alimentação, constataram que as mensurações de comprimento e rendimentos de carcaça apresentaram resposta linear, em que os valores se elevaram com o aumento do nível de monensina suplementar.

Com relação ao uso da monensina na produção de leite, resultados de pesquisa apresentam-se inconsistentes. Ressalta-se o fato de somente a partir 1997 ter sido liberado o uso de ionóforos para vacas de leite nos Estados Unidos, onde se utilizam ionóforos em aproximadamente 95% de seus bovinos confinados. Van Amburgh et al. (1997) atribuem essa inconsistência à influência dos diferentes tipos de dietas utilizados nos ensaios. Em revisão de literatura, esse autor observou efeitos inconsistentes para o teor de proteína do leite. No entanto, nota-se que ocorre consistência nos resultados que avaliam o parâmetro teor de gordura do leite, havendo redução deste diante do uso de ionóforos.

Em trabalho conduzido na Europa, Van Der Werf et al. (1998) observaram reduções significativas no conteúdo de gordura do leite para animais recebendo 400 mg de monensina/dia, enquanto o conteúdo de proteína não foi afetado de forma significativa.

O efeito benéfico da suplementação de vacas leiteiras com monensina em evitar a ocorrência de cetose subclínica pôde ser demonstrado por Duffield et al. (1998). De fato, Sauer et al. (1989) e Thomas et al. (1993), trabalhando com vacas secas e em lactação, observaram menores níveis de β -hidroxibutirato (BHBA) no metabolismo de animais recebendo monensina, com ocorrência de maiores níveis de glicose sanguínea. A cetose subclínica está relacionada de forma direta com a ocorrência de outros distúrbios metabólicos e reduções na produção de leite, decorrente do comprometimento do “status” energético do animal acometido por esse distúrbio.

1.6. A própolis

A própolis é um produto natural proveniente de substâncias (resinas) coletadas das plantas, pelas abelhas, e misturadas com suas secreções. As abelhas modificam a composição original da resina da planta misturando-as com secreções das glândulas hipofaríngeas, especialmente β -glicosidases. Dessa forma, os flavonóides heterosídeos são hidrolisados para a forma de agliconas livres, o que aumenta a ação farmacológica destes compostos (Bonhevi et al., 1994; Park & Ikegaki, 1998). Tem sido objeto de estudo em diversos países, por tratar-se de um subproduto da apicultura que tem demonstrado importantes propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante (Ghisalberti, 1979). Apresenta como descrição física e características sensoriais: aroma característico (balsâmico e resinoso), dependendo da origem botânica, cor variável – desde a amarelada, parda, esverdeada clara ao pardo escuro –, sabor de suave balsâmico a forte, amargo e picante e consistência maleável à ligeiramente rígida, à temperatura ambiente, e rígida, em temperaturas abaixo de 20°C (Apacame, 1999).

Segundo Marcucci (1995), grande número de substâncias tem sido encontrado nas amostras de própolis: ceras, resinas, bálsamos, óleos aromáticos, pólen e outras substâncias orgânicas. É composta, em média, por 55% de resinas e bálsamos, 30% de ceras, 10% de óleos voláteis e 5% de pólen (Ioirish, 1975; Nikolaev, 1975; Ghisalberti, 1979; Grange & Davey, 1990; Bonvehi et al., 1994).

Possui uma composição química complexa, contendo mais de 160 componentes. Entre os compostos químicos identificados, podem ser citados os flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas), chalconas, ácido benzóico e derivados, benzaldeídos, álcoois, cetonas, fenólicos, heteroaromáticos, álcool cinâmico e derivados, ácido cafeico e derivados, ácidos diterpenos e triterpenos, minerais e outros (Walker & Crane, 1987; Bonvehi et al., 1994; Marcucci, 1995; Bankova et al., 1998; Seixas et al., 2000; Soares et al., 2000).

Diversos autores atribuem aos flavonóides (flavonas, flavolonas e flavononas) a

maior capacidade de atuarem como agentes antiviróticos, antiparasitários, antibacterianos e antioxidantes, propriedades farmacológicas observadas na própolis (Grange & Davey, 1990; Bonvehi et al., 1994; Langoni et al., 1994; Bankova et al., 1995).

Mattos (2000) demonstrou que a maioria das amostras de própolis brasileiras, contrariamente à própolis oriunda de países de clima temperado, contém mais de 50% de seus flavonóides e substâncias ativas associados a moléculas de açúcar (agliconas) e, portanto, são dependentes da presença de água na extração para serem melhor solubilizadas e, assim, aumentar seu potencial farmacológico. De fato, ao avaliarem amostras de própolis brasileira, Park et al. (1998) observaram maior porcentagem de inibição do crescimento microbiano proporcionado pelos extratos etanólicos de própolis a 60, 70 e 80%, com decréscimos nesta atividade nas porcentagens mais altas de etanol (90 e 95%).

Ao contrário da própolis de regiões temperadas, onde o “choupo” (*Populus* sp.) é sua única fonte, no Brasil há maior diversidade de plantas que podem ser adotadas pelas abelhas como fonte de própolis, em diferentes regiões. Assim, sua composição química pode diferir entre uma amostra e outra. Dois importantes fatores para a definição da composição química da própolis são as variações sazonais e regionais de coleta.

Bankova et al. (1998) observaram alterações quantitativas nos teores de compostos essenciais da própolis (ácidos fenólicos, diterpênicos, entre outros) quando avaliaram amostras de própolis coletadas em um mesmo local, porém em diferentes estações do ano (diferentes composições florísticas). Constatou-se que, enquanto alguns compostos apresentavam concentrações reduzidas, outros apresentavam concentrações elevadas. Já Koo & Park (1997) procuraram avaliar amostras de própolis advindas de diferentes regiões do Brasil, constatando-se a presença de quantidades diferentes de certos flavonóides na forma de agliconas em suas composições. É importante ressaltar que os flavonóides são os principais componentes biologicamente ativos quanto à ação antibacteriana da própolis. Nesse

trabalho, foram encontrados valores que variaram de 23,71 a 48,46 mg de flavonóides por grama de própolis, tendo a própolis da região Sudeste apresentado o maior valor, enquanto à própolis da região Sul coube o menor valor. Trata-se de resultados previsíveis, devido à baixa diversidade de plantas visitadas pelas abelhas no sul, contrariamente à região Sudeste, principalmente algumas subregiões de Minas Gerais, que apresentam rica composição florística.

Entretanto, Park et al. (2000), ao classificarem a própolis de variadas regiões do Brasil a partir de suas características físico-químicas e propriedades antimicrobianas, constataram eficiência similar da própolis de uma localidade do Estado do Paraná (Sul) com a própolis do Estado de São Paulo (Sudeste), quanto à inibição, *in vitro*, da bactéria gram-positiva *S. aureus* (alo de inibição de 3 mm), mostrando que mesmo a própolis com baixa diversidade de resinas ou concentrações de flavonóides pode apresentar alguma ação antibacteriana.

Bankova et al. (1992) ponderam sobre a necessidade de se conhecer a composição qualitativa e quantitativa dos flavonóides da própolis, devido à diversificada atividade biológica e ao crescente aumento do interesse da indústria farmacêutica, sendo esse conhecimento de grande importância para padronização de drogas.

1.7. Relatos da atividade antibacteriana da própolis

Langoni et al. (1994), estudando a eficácia antimicrobiana da própolis *in vitro*, proveniente de apiários em Botucatu, SP, observaram 100% de inibição do crescimento de estirpes de *Staphylococcus aureus*. Park et al. (2000) também observaram forte efeito inibitório da própolis coletada na região Sudeste do Brasil sobre essa espécie, quando procuravam avaliar grupos de própolis classificados de acordo com sua procedência, quanto às diferentes regiões do país.

As bactérias gram-positivas *Corynebacterium pyogenes* e *S. aureus* mostraram-se sensíveis ao extrato etanólico de própolis procedente do Estado da Bahia, enquanto

a gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* se mostrou mais resistente. Resultados semelhantes foram verificados por Vargas et al. (1994), que utilizaram própolis obtida em apiários da região de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul.

Quanto ao tempo de exposição das bactérias frente aos extratos de própolis com concentrações aproximadamente iguais ou maiores que as respectivas concentrações mínimas inibitórias (MIC), Fernandes Jr. et al. (1997) observaram efeito bactericida marcante a partir de 6 a 9 horas de exposição.

Bankova et al. (1996), ao isolarem componentes da própolis brasileira e estudá-los quanto a seus efeitos bactericidas, verificaram que nenhum componente isolado possuía atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* tão potente quanto a observada com todo o extrato, o que possibilita referenciar a própolis como produto natural de ação antibiótica.

1.8. A própolis como alternativa de manipulação da fermentação ruminal

A atividade antimicrobiana da própolis ocorre pela inibição de bactérias classificadas como gram-positivas (Ghisalberti, 1979; Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Park et al., 1998; Park et al., 2000), tendo sido constatada a inibição, tanto *in vitro* (Langoni et al., 1994; Vargas et al., 1994), quanto *in vivo* (Pinto, 2000), do crescimento de bactérias gram-positivas, responsáveis pela incidência de mastite em bovinos leiteiros. Entretanto, não há relatos da aplicabilidade da própolis como aditivo nutricional para ruminantes e de seus efeitos sobre a população microbiana ruminal. Se a própolis atua sobre as bactérias gram-positivas ruminais, pressupõe-se que a sua adição à ração e em cultivos de microrganismos *in vitro*, assim como ocorre com os ionóforos, iniba o crescimento de bactérias proteolíticas e, conseqüentemente, a desaminação e a proteólise. Pressupõe-se, ainda, que ocorra a inibição de bactérias produtoras de lactato, o que permitiria ao nutricionista explorar o vigor produtivo dos animais, elevando-se a quantidade de concentrado na ração, sem riscos de ocorrência de acidose láctica. Por fim, pressupõe-se uma inibição

direta ou indireta da produção de metano, com conseqüente economia de energia no processo digestivo do animal, além da diminuição da poluição ambiental.

1.9. Relatos de desempenho animal com a própolis

Encontram-se na literatura somente dois trabalhos, com animais monogástricos, que procuraram estudar os efeitos da própolis sobre o desempenho desses animais. Anderson et al. (1970), citados por Ghisalberti (1979), utilizaram 5 ppm de extrato etanólico de própolis em dietas basais de galinhas e observaram aumento de 20% no ganho de peso desses animais.

Dierckx & Funari (1999), estudando o efeito de diferentes concentrações de própolis em rações isoprotéicas (18% PB) sobre o desempenho produtivo de leitões desmamados, obtiveram resultados não-significativos para ganho de peso, consumo e conversão alimentar desses animais, embora tenha sido constatada tendência de pior desempenho para os animais não-suplementados com própolis.

Com ruminantes, conforme referido anteriormente, não há relatos da aplicabilidade da própolis como aditivo nutricional e de seus efeitos sobre a população microbiana ruminal.

2. LITERATURA CITADA

- ALVES FILHO, D.C.; RESTLE.J., NEUMANN, M. et al. Efeito da monensina sódica sobre as características quantitativas da carcaça de novilhas. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 12., 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. p.413.
- ANDRADE, V.J.; CORDEIRO, J.S.; FERREIRA, M.B.D. et al. Monensina na terminação de novilhos mestiços zebu x Angus, a pasto. In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1996. p.23-25.
- ANUALPEC 2001. Anuário da Pecuária Brasileira. Ed. Argos Comunicação. 359p.
- Associação Paulista de Apicultores Criadores de Abelhas Melíficas Européias - APACAME. Regulamentos técnicos para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Mensagem Doce**, n.52, p.13-14, 1999.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G. et al. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v.607, p.150-153, 1992.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A. et al. Chemical composition and antibacterial activity of brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.50, n.3-4, p.167-172, 1995.
- BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; SIMOVA, S. et al. Antibacterial diterpenic acids from brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.51, n.5-6, p.277-280, 1996.

- BANKOVA, V.; KRASTEVA, G.B.; POPOV, S. et al. Seasonal variations of the chemical composition of brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, n.4, p.361-367, 1998.
- BARRAGRY, T.B. Growth-promoting agents. In: **Veterinary drug therapy**. Philadelphia: L&A e Febiger, 1994. p.597-654.
- BERGEN, W.G.; BATES, D.B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1465, 1984.
- BOIN, C.; LEME, P.R.; NARDON, R.F. et. al. A monensina sódica no ganho de peso e na conversão alimentar de zebuínos em confinamento. **Zootecnia**, v.22, n.3, p.247-55, 1984.
- BONVEHI, J.S.; COLL, F.V.; JORDÁ, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemists Society**, v.71, n.5, p.529-532, 1994.
- BRANCO, A.F. et al. Efeito da lasalocida sódica, na dieta de bovinos em confinamento, sobre as características de produção e carcaça. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.25, n.4, p.713-22, 1996.
- BROWN, H.; HOGUE, L. Effects of feeding monensin sodium to lactating goats: milk composition and ruminal volatile fatty acids. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1141, 1985.
- CHEN, G.; RUSSELL, J.B. Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation, and deamination by mixed ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v.69, p.2196-2203, 1991.
- DIERCKX, S.M.A.G.; FUNARI, S.R.C. Uso da própolis na alimentação de leitões desmamados como aditivos e na prevenção à diarreia. **Archives Latinoamericanas de Producción Animal**, v.7, n.2, p.109-116, 1999.
- DINIUS, D.A.; SIMPSON, M.E.; MARSH, P.B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. **Journal of Animal Science**, 42:229-234, 1976.
- DUFFIELD, T.F.; SANDALS, D.; LESLIE, K.E. et al. Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.11, p.2866-2873, 1998.
- FERNANDES Jr., A.; LOPES, C.A.M.; SFORCIN, J.M. et al. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.3, n.2, 1997.

- GHISALBERTI, E.L. Propolis; a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.
- GOODRICH, T.B.; GARRETH, J.E.; GAST, D.R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1484-1498, 1984.
- GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1995. 18p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal da Bahia, 1995.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, n.3, p.159-160, 1990.
- HENDERSON, C.; STEWART, C.S.; NEKREP, F.V. The effect of monensin on pure and mixed cultures of rumen bacteria. **Journal of Applied Bacteriology**, v.51, p.159-69, 1981.
- IOIRISH, N. Propoleos. In: COMISION PERMANENTE DE TECNOLOGIA Y UTILLAJE APICOLAS. **Un valioso producto de la apicultura: Propoleos - Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**. Bucarest: 1975. p.89-90.
- KOO, M.H.; PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.61, n.2, 367-369, 1997.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. **Journal of Animal Science**, v.75, p.224-229, 1997.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.C. et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* da propolis. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994, Rio Cuarto, Argentina. **Anais...** Rio Cuarto, Argentina: 1994. p.189-192.
- LEMENAGER, R.P.; OWEENS, F.N.; SHOCKEY, J. et al. Monensin effect on rumen turnover rate, twenty-four hour VFA pattern, nitrogen components and cellulose disappearance. **Journal of Animal Science**, v.47, p.255, 1978.
- McCAUGHEY, W.P.; WITTENBERG, G.K.; CORRIGAN, D. Methane production by steers on pasture. **Canadian Journal of Animal Science**, v.77, p.519-24, 1997.

- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8.ed. London: Prentice Hall, 1997. p.566.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, n.2, p.83-99, 1995.
- MATTOS, L.M. **Métodos de análise de flavonóides e atividades antioxidante da propolis**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. 87p.
- MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- MORAES, C.A.C.; FONTES, C.A.A; LANA, R.P. et al. Influencia da monensina sobre o ganho de peso, consumo e conversão alimentar em bovinos castrados e não castrados. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.22, n.1, p.64-71, 1993a.
- MORAES, C.A.C.; FONTES, C.A.A; LANA, R.P. et al. Influencia da monensina sobre o rendimento de carcaça e de seus cortes básicos e outras características em bovinos castrados e não castrados. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.22, n.1, p.71-80, 1993b.
- MORAES, C.A.C.; FONTES, C.A.A; LANA, R.P. et al. Influencia da monensina sobre a composição física e química da carcaça de bovinos castrados e não castrados. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.22, n.6, p.952-959, 1993c.
- MOSS, A.R. Ethane production by ruminants – reviews. **Nutrition Abstract and Review**, v.64, n.12, p.785-806, 1994. (Series B)
- NAGARAJA, T.G.; AVERY, T.B.; BRATTEY, E.E. et al. Effect of lasalocid, monensin, or thiopeptin on lactic acidosis in cattle. **Journal of Animal Science**, v.54, p.649-658, 1982.
- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds). **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic & Professional, 1997. p.523-632.
- NIKOLAEV, A.B. Defensa de la ciudad de las abejas. In: COMISION PERMANENTE DE TECNOLOGIA Y UTILLAJE APICOLAS. **Un valioso producto de la apicultura: Propoleos - Investigaciones científicas y opiniones acerca de su composición, características y utilización com fines terapéuticos**. Bucarest: 1975. p.8-10.

- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; IKEGAKI, M. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.40, n.1, p.97-106, 1997.
- PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.11, p.2230-2232, 1998.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v.58, n.9, p.3-7, 2000.
- PARROT, C.J.; CONRAD, M.J.; BASSON, P.R. The effect of a monensin ruminal delivery device on performance of cattle grazing pasture. **Journal of Animal Science**, v.68, n.7, p.2614-2621, 1990.
- PINTO, M.S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- RANDELL, R.D.; ROUQUETTE, F.M. Effect of monensin on lactation in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.43, p.232, 1976.
- RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C.; NEUMANN, M. et al. Efeito da monensina sobre as características quantitativas da carcaça de vacas de descarte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 12., 2000, Viçosa-MG. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000a. p.410.
- RESTLE, J.; ALVES FILHO, D.C.; NEUMANN, M. et al. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 12., 2000, Viçosa-MG. **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000b. p.411.
- RODE, L.M.; LYSYK, L.T.J.; BEAUCHEMIN, K.A. et al. Intake of lasalocid-containing mineral supplements by grazing beef heifer. **Canadian Journal of Animal Science**, v.74, n.1, p.77-82, 1994.
- RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Effects of additives on in vitro ruminal fermentation: a comparison of monensin and bacitracin, another Gram-positive antibiotic. **Journal of Animal Science**, v.66, p.552, 1988.

- RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, n. 1, p.1-6, 1989.
- RUSSELL, J.B. Bacteria: mechanisms of ionophore action in ruminal bacteria. Proc. Symp. Scientific Update on Rumensin/Tylan for the Professional Feedlot Consultant, Amarillo, TX., **Elanco Animal Health**, Indianapolis, IN, p.E1-E19, 1996.
- SALLES, M.S.V.; LUCCI, C.S. Monensina para bezerros ruminantes em crescimento acelerado. I. desempenho. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998. p.446-448.
- SALLES, M.S.V.; LUCCI, C.S. Monensina para bezerros ruminantes em crescimento acelerado. 2. Digestibilidade e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, p.582-588, 2000.
- SAUER, F.D.; KRAMER, J.K.G.; CANTWELL, W.J. Antiketogenic effects of monensin in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.72, p.436-442, 1989.
- SCHELLING, G.T. Monensin mode of action in the rumen. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1518-1527, 1984.
- SEIXAS, F.R.M.S.; PEREIRA, A.S.; RAMOS et al. Composição química da própolis brasileira das regiões sul e sudeste. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: 2000. v.2, PN-050.
- SOARES, J.D.M.; CITÓ, A.M.G.; LOPES, J.A.D. et al. Triterpenos isolados de própolis piauiense. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 23., 2000, Poços de Caldas. **Livro de resumos...** Poços de Caldas: 2000. v.2, PN-054.
- SPROTT, L.R.; CORAH, L.R.; RILEY, J.G et al. The effects of rumensin and two levels of energy prior to calving on reproductive performance of first calf heifers. **Kansas Agr. Exp. Sta. Rep. of Prog.**, v.394. 44p, 1981.
- THOMAS, E.E.; POE, S.E.; McGFFEY, R.K. et al. Effect of feed monensin on milk production and on serum metabolics during early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.76 (suppl. 1), p.280 (abstract), 1993.
- VALADARES FILHO, S.C. Nutrição, avaliação de alimentos e tabelas de composição de alimentos para bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 12., 2000, Viçosa, MG, **Anais...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. p.267-338.

- VARGAS, A.C.; POCAI, E.A.; FONTANA, F.Z. et al. Dados parciais do teste “in vitro” da atividade antibacteriana da própolis. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, 1., CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 12., 1994, Porto Alegre. **Anais....** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. 160p.
- Van Der WERF, J.H.J.; JONKER, L.J.; OLDENBROEK, J.K. Effects of monensin on milk production by Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.427-433, 1998.
- Van AMBURGH, M.E.; GALTON, D.M.; BAUMAN, D.E. Management and economics os extended calving intervals wilhuse of bovine somatotropin, **Livestock Production Science**, v.50, n.1-2, p.15-28, 1997.
- WALKER, P.; CRANE, E. Constituents of propolis. **Apidologie**, v.18, n.4, p.327-334, 1987.
- YANG, C.M.J.; RUSSELL, J.B. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Applied Environment Microbiology**, v.59, p.3250-3254, 1993a.
- YANG, C.M.J.; RUSSELL, J.B. The effect of monensin supplementation on ruminal ammonia accumulation in vivo and the numbers of amino-acid fermenting bacteria. **Journal of Animal Science**, v.71, p.3470-3476, 1993b.

Ação da Própolis sobre a Desaminação de Aminoácidos e a Fermentação Ruminal

RESUMO - Foram objetivos deste trabalho determinar a ação *in vitro* da própolis sobre a atividade específica de produção de amônia (AEPA) ou atividade de desaminação de aminoácidos e sobre a fermentação ruminal em bovinos. A AEPA foi determinada utilizando-se líquido de rúmen e tampão de McDougall (1:4) contendo diferentes níveis de extrato de própolis e excesso de caseína hidrolisada. No estudo da ação da própolis *in vivo* sobre a fermentação ruminal e AEPA, foram utilizados quatro novilhos Holandeses, em dois períodos experimentais, sob dieta contendo 35% de concentrado, submetidos aos tratamentos controle e com extrato de própolis. O extrato de própolis obtido com etanol a 70% em água foi mais eficiente *in vitro* que a 99,5%, obtendo-se valores de até 78% de inibição da AEPA em relação ao controle. O extrato de própolis não afetou o consumo de matéria seca, o pH, as concentrações de amônia e de proteína microbiana e as proporções molares dos ácidos graxos voláteis (AGV), acético, propiônico e butírico no líquido de rúmen. Entretanto, o extrato de própolis aumentou a concentração de AGV totais e inibiu a AEPA pelos microrganismos ruminais, indicando que, apesar de não ter reduzido o nível ruminal de amônia, existe o potencial deste efeito ocorrer em outras situações, como em dietas contendo alta taxa de proteína degradável/carboidrato fermentescível, observado em pastagens novas de gramíneas ou pastagens de gramíneas consorciadas com leguminosas.

Palavras-chave: amônia, fermentação ruminal, pH, AGV, proteína

Effect of the Propolis on Deamination of Amino Acids and on the Ruminal Fermentation

ABSTRACT - The objective of this work was to determine the In vitro effect of the propolis on the specific activity of ammonia production (SAAP) or activity deamination of amino acids and on the ruminal fermentation in bovine. The specific activity of ammonia production was determined using ruminal fluid and McDougall buffer (1:4) with different levels of propolis extract and excess of hydrolyzed casein. In the study of the In vivo effect of the propolis on the ruminal fermentation and SAAP, four Holstein steers were used, in two experimental periods, fed diet with 35.0% of concentrate and submitted to the control and propolis extract treatments. The propolis extract obtained with ethanol at 70% in water was In vitro more efficient than that obtained with ethanol at 99.5% in water. Values up to 78% of inhibition of SAAP in relation to the control were obtained. The propolis extract did not affect the dry matter intake, the pH, the ammonia concentrations and of microbial protein and the molar proportions of the volatile fat acid (VFA), acetic, propionic and butyric in the rumen fluid. However, the propolis extract increased the total VFA concentration and it inhibited SAAP by the ruminal microorganisms, demonstrating that, in spite of not having reduced the ruminal ammonia level, exists the potential of this effect to happen in another situations, as in diets with high rate of degradable protein /fermentable carbohydrate, observed in new grass pastures or grass pastures consociated with legumes.

Key Words: ammonia, ruminal fermentation, pH, VFA, protein

Introdução

Nas últimas três décadas, a pecuária bovina brasileira tem sofrido um estreitamento na relação benefício/custo, em parte, resultado da competitividade de outros mercados. Diante dessa realidade, fica a certeza de não mais haver espaço para improvisações e descuidos na bovinocultura. Em todas as etapas, a eficiência deve presidir o processo produtivo, não só pela observância de aspectos do mercado de consumo, mas também pelo respeito aos detalhes técnicos, como os relativos ao manejo e ao arraçamento dos animais

Entre as exigências impostas pelos mercados importadores dos produtos de origem bovina, a observância de que os animais tenham sido alimentados com rações isentas de antibióticos aditivos e promotores de crescimento é considerada a principal. Este tipo de exigência também é observado no mercado interno por intermédio de movimentos de associações de consumidores. Logo, a busca e utilização de aditivos naturais que possam suprir, ao menos em equivalência, o uso desses antibióticos no quesito produtividade constituíram o diferencial de qualidade, por isentarem os produtos de qualquer toxicidade, favorecendo o ganho em competitividade para esses produtos.

A própolis é um produto natural proveniente de substâncias (resinas) coletadas das plantas, pelas abelhas, e misturadas com suas secreções. As abelhas modificam a composição original da resina da planta misturando-as com secreções das glândulas hipofaríngeas, especialmente β -glicosidases. Dessa forma, os flavonóides heterosídeos, principais compostos de ação antibacteriana da própolis, são hidrolisados para a forma de agliconas livres, o que aumenta a ação farmacológica destes compostos (Bonhevi et al., 1994; Park & Ikegaki, 1998).

Objeto de estudo em diversos países, a própolis, subproduto da apicultura, tem demonstrado importantes propriedades terapêuticas, como atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante (Ghisalberti, 1979).

Segundo Mirzoeva et al. (1997), a própolis e alguns de seus componentes possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora. Logo, a atividade antimicrobiana da própolis ocorre pela inibição de bactérias classificadas como gram-positivas (Ghisalberti, 1979; Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Park et al., 1998a; Park et al., 2000).

Foi constatada, recentemente, a inibição do crescimento de bactérias gram-positivas, responsáveis pela incidência de mastite em bovinos leiteiros (Pinto, 2000). Entretanto, não há relatos da aplicabilidade da própolis como aditivo nutricional para ruminantes e de seus efeitos sobre a população microbiana ruminal.

Se a própolis atua sobre as bactérias gram-positivas ruminais, espera-se que sua adição à ração e em cultivos de microrganismos *in vitro*, assim como ocorre com os ionóforos, iniba o crescimento de bactérias proteolíticas (Hino & Russell, 1986) e, conseqüentemente, a desaminação e a proteólise (Russell & Martin, 1984). Em relação à produção de ácidos graxos voláteis, espera-se que ocorra aumento na produção de propionato, com conseqüente redução na relação acetato:propionato no rúmen. A redução dessa relação é benéfica, na medida em que menores produções de acetato disponibilizem, no rúmen, menores quantidades de carbono e hidrogênio que seriam utilizados para a produção de metano. Sabe-se que a redução na produção de metano é sinônimo de melhoria na eficiência energética, com conseqüente melhoria no desempenho animal. Segundo Lana et al. (1998), a produção de gás metano pelas bactérias ruminais e intestinais pode corresponder a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido. Essa redução implica ainda na diminuição da poluição ambiental, em virtude de o gás metano ser responsável pela destruição da camada de ozônio.

Objetivou-se, neste trabalho, determinar a ação da própolis sobre a desaminação *in vitro* de aminoácidos e a fermentação ruminal em bovinos recebendo dieta contendo 35% de concentrado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Setor de Bovinos e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa/MG.

A cidade de Viçosa localiza-se na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, a 20°45' de Latitude Sul e 42°51' de Longitude Oeste e a altitude de 649 m. De acordo com dados fornecidos pelo Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, o clima de Viçosa é subtropical, com inverno frio e seco, e verão quente e úmido, sendo classificado como Cwa subtropical. Apresenta precipitação pluviométrica anual média de 1342 mm, sendo que 80% das chuvas ocorrem entre os meses de outubro e março, período chuvoso, e os 20% restantes, entre os meses de abril e setembro, período seco. A temperatura média das máximas é de 26,1°C; a média das mínimas, de 14°C; e a umidade relativa do ar, de 80%.

A própolis bruta foi adquirida de uma apicultura instalada na Zona rural de Viçosa, safra de primavera. A vegetação de plantas visitadas pelas abelhas é bastante diversificada nessa localidade (Zona da Mata mineira), o que confere à própolis excelente classificação em qualidade.

Na obtenção do extrato de própolis, foram utilizados 30 g de própolis bruta triturada para cada 100 mL de solução alcoólica (99,5 ou 70,0%, correspondendo às técnicas da extração em etanol e etanol hidratado, respectivamente), por um período de 10 dias. Em seguida, foi feita a filtração em papel-filtro, obtendo-se a solução estoque. Foram feitas diluições da solução estoque utilizando-se 0,0; 16,7; 33,3; 50,0; 66,7; 83,3; e 100,0% da mesma.

Passos da extração



Foto 1 - Pedra bruta de própolis.



Foto 2 - Pedra moída de própolis (triturada).



Foto 3 - Fases separadas (superior = extrato; inferior = cera).



Foto 4 - Extrato de própolis (solução estoque).

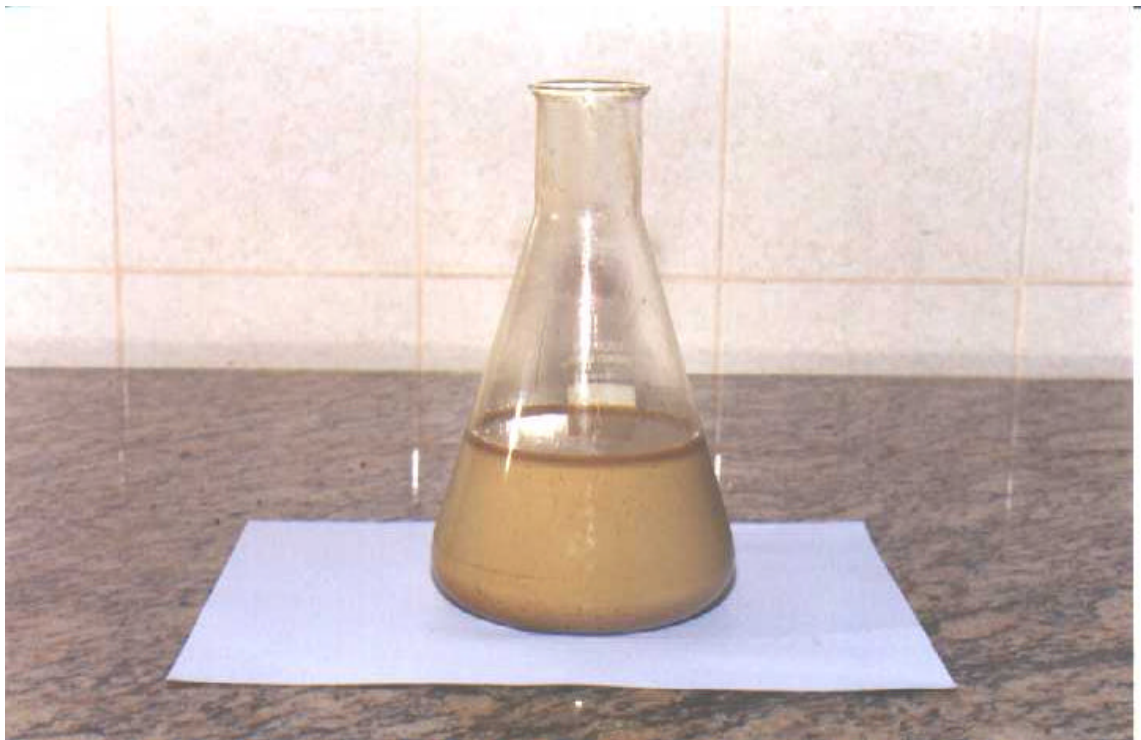


Foto 5 - Cera.

Para determinação *in vitro* da proteína microbiana, do pH, da amônia e atividade específica da produção de amônia (AEPA), foi utilizado o líquido ruminal de um animal recebendo forragem, coletado duas horas após o arraçoamento, filtrado em quatro camadas de gaze e transportado anaerobicamente para o laboratório. Na seqüência, o líquido foi transferido para um erlenmayer e mantido a 39°C (anaerobiose), para a separação da fase líquida (contendo bactérias) dos protozoários e das partículas dos alimentos (fases mais densa e o sobrenadante, respectivamente). O inóculo foi obtido da diluição da fase líquida em solução tampão de McDougall, na proporção de 1:4, em condições anaeróbicas, e então utilizado nas incubações.

As incubações foram feitas anaerobicamente a 39°C em frascos contendo 8,8 mL do inóculo, 1 mL de solução contendo 15% de caseína hidrolisada

(trypticase) e 0,2 mL das soluções alcoólicas referidas na obtenção do extrato de própolis.

Foram coletadas amostras do inóculo para determinação de proteína microbiana (Lowry et al., 1951) e amostras dos frascos, às 0 e 4 horas de incubação, para análises de pH e amônia (Chaney & Marbach, 1962).

A atividade específica de desaminação ou a capacidade das bactérias em desaminar aminoácidos foi calculada em função do diferencial de concentração de amônia nos frascos de incubação (4-0 horas; mmolar), dividido pela concentração da proteína microbiana no meio de cultura ao início da incubação (mg/L), e então dividido pelo tempo de incubação (minutos) (Lana & Russell, 1997), conforme o esquema abaixo:

$$\text{AEPA (nmol/mg Proteína/min)} = ([\text{NH}_3] \times 1.000.000) / \text{PTN microb} / \text{tempo(min)}$$

$[\text{NH}_3]$ = concentração final – inicial de amônia (mM); e

Proteína microbiana (PTN microb) = concentração inicial (mg/L)

Foram realizadas análises de regressão dos níveis de própolis sobre a atividade de desaminação *in vitro*.

Para determinação *in vivo* da proteína microbiana, do pH, dos AGV, da amônia e atividade específica da produção de amônia (AEPA), foram utilizados quatro novilhos Holandeses fistulados no rúmen (480 kg de PV) recebendo dieta (12,7% de PB) contendo 65% de feno de braquiária, 10% de farelo de soja e 25% de fubá de milho, fornecida *ad libitum*, a cada seis horas, para assegurar estabilidade das condições ruminais (Gonçalves, 2001).

O experimento consistiu de dois períodos experimentais de sete dias; no primeiro período foram fornecidos 8 mL de etanol/animal a cada 6 horas através da fístula ruminal e no segundo, 8 mL da solução estoque em etanol 70%, diluída para 50% da mesma.

Foi determinado o consumo de matéria seca pelos animais e coletado o líquido ruminal imediatamente antes e duas horas após as alimentações das 6 e 12 horas, nos dias 6 e 7 de cada período experimental, para análises de amônia, AGV's e pH ruminal, e duas horas após, para determinação da AEPA, conforme descrito no experimento 1, com exceção da própolis, que foi adicionada e homogeneizada ao líquido do rúmen via fístula ruminal, e não *in vitro*.

As análises de ácidos graxos voláteis foram efetuadas em cromatógrafo de gás, segundo os procedimentos descritos por Barbosa (2000). Assim, as amostras do líquido centrifugado foram diluídas na proporção de 500 µl para 500 µl de ácido fosfórico (25%) e novamente centrifugadas a 13.000 r.p.m. por 20 minutos, até que as alíquotas ficassem totalmente livres de impurezas.

O padrão utilizado para o cálculo das concentrações de ácidos graxos voláteis nas amostras foi preparado da seguinte forma: em um balão volumétrico de 50 mL, completaram-se 50 mL com ácido fosfórico a 25% e pipetado, por intermédio de pipeta automática, 171 µl de ácido acético, 149 µl de ácido propiônico, 138 µl de ácido butírico, 23 µl de ácido isobutírico, 27 µl de ácido isovalérico e 27 µl de ácido valérico. Essas quantidades foram pipetadas para que a concentração final do ácido padrão fosse de 60, 40, 30 e 5 mM (mili molar) dos ácidos acético, propiônico, butírico e demais ácidos, respectivamente.

A coluna utilizada foi a Nukol da Supelco. Os parâmetros do equipamento foram: temperatura inicial de 100°C e final de 200°C para a coluna, 220 e 240°C para o injetor, 250 e 270°C para o detector de chama. O modelo para controle foi determinado por split, com uma pressão da coluna de 150 kPA, fluxo da coluna de 1.90647 mL/min, velocidade linear de 43.228 cm/s, fluxo total de 158 mL, largura de 30 m e diâmetro da coluna de 0,25 mm. Os cálculos foram realizados por intermédio da área em que se adotou o método de normalização correta.

Os dados resultantes do experimento com os animais fistulados foram analisados pelo teste de t para avaliar a diferença entre os dois tratamentos (sem e com adição de extrato de própolis), utilizando-se quatro animais em dois períodos,

totalizando oito unidades experimentais. Cada unidade experimental consistiu de quatro coletas de líquido de rúmen, duas horas após a alimentação, que foi fornecida em quatro porções diárias a cada seis horas. Os dados de cada unidade experimental foram obtidos pela média de duas análises laboratoriais. A atividade específica de desaminação foi novamente realizada conforme procedimento acima, à exceção da própolis, que foi adicionada à dieta dos animais, e não *in vitro*.

Resultados e Discussão

Os extratos de própolis obtidos por ambas as técnicas (extração em etanol e etanol hidratado) foram eficientes em reduzir a AEPA pela população microbiana ruminal (Figura 1). A extração com 70% de etanol foi mais eficiente, pois, mesmo quando diluída a 33,3%, causou os maiores valores de inibição (78%).

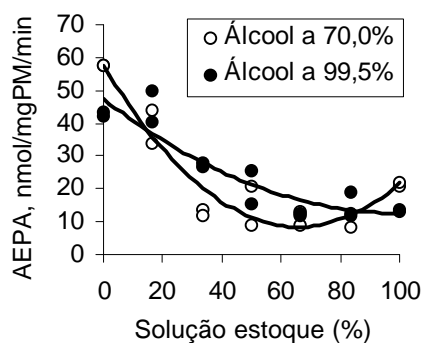


Figura 1 - Efeito de níveis de solução estoque contendo extrato de própolis, em diluição com o mesmo álcool usado na extração, sobre a atividade específica de produção de amônia (AEPA) ou atividade de desaminação, em nmol NH₃/mg de proteína microbiana/minuto de incubação, por microrganismos ruminais incubados anaerobicamente a 39°C em meio contendo 15 g/L de caseína hidrolisada (trypticase).

Park et al. (1998b) também observaram maior porcentagem de inibição do crescimento microbiano proporcionado pelos extratos etanólicos de própolis a 60, 70 e 80%, com decréscimos nesta atividade nas porcentagens mais altas de etanol (90 e 95%). Segundo Woisky & Salatino (1998) e Park et al. (1998), a técnica do etanol hidratado tem apresentado maior poder de extração dos compostos terapêuticos da própolis.

Em trabalhos *in vitro*, a monensina (5 micro molaes) diminuiu de 3% a 36% a AEPA, pela população microbiana, quando incubada EM um meio contendo 15 g/L de caseína hidrolisada (Chen & Russell, 1991; Yang & Russell, 1993), valores inferiores aos observados no presente trabalho.

O efeito da monensina na inibição da produção ruminal de amônia foi inicialmente observado por Dinius et al. (1976). Em experimento com bovinos recebendo feno de gramínea e 0, 1 e 2 kg de farelo de soja/animal/dia, Yang & Russell (1993) verificaram que a monensina reduziu de 30 a 54% o nível ruminal de amônia e de 28 a 38% a AEPA. Em dietas contendo de 100% de feno de gramíneas a 100% de feno de leguminosas, Lana & Russell (1997) verificaram que a monensina reduziu em até 28% o nível ruminal de amônia e de 18 a 25% a AEPA.

Não houve efeito de tempo e interação tempo*tratamento sobre o pH e a amônia, indicando que houve estabilidade das condições ruminais, ao se fornecer a alimentação aos animais a cada seis horas.

Em relação ao trabalho *in vivo*, verifica-se na Tabela 1 que o extrato de própolis não afetou o consumo de matéria seca, o pH e a amônia ruminais e a concentração de proteína microbiana no líquido de rúmen (diluído em 1:4 com solução tampão de McDougall). Entretanto, a própolis inibiu ($P < 0,001$) a AEPA pelos microrganismos ruminais, indicando que, apesar de não ter reduzido o nível ruminal de amônia, há o potencial deste efeito ocorrer em outras situações, como em dietas contendo alta taxa de proteína degradável/carboidrato fermentescível, como no caso de animais sob pastagens novas de gramíneas ou pastagens de gramíneas consorciadas com leguminosas.

O extrato de própolis não afetou a proporção dos ácidos acético, propiônico e butírico no total de ácidos graxos no líquido ruminal. Entretanto, o extrato de própolis aumentou ($P < 0,001$) a concentração total de AGV's. Embora não-significativo, o extrato de própolis aumentou em 15% a relação acetato:propionato, mostrando-se contrário ao observado em estudos que utilizam modificadores da fermentação ruminal, a exemplo de lipídios e ionóforos. O uso desses aditivos, via de regra, resulta em aumentos da concentração molar de propionato no rúmen. Essa alteração molar de propionato no rúmen deve-se principalmente à diminuição da atividade dos microrganismos celulolíticos (digestão de tecidos fibrosos), com conseqüente diminuição nas taxas de renovação ruminal (Vannevel & Demyer, 1988; Spears, 1990). Segundo Thornton & Owens (1981) e Spears (1990), os ionóforos selecionam uma comunidade bacteriana que produz mais propionato e menos acetato e butirato. Portanto, confirmando em novos estudos a ocorrência de aumento da relação acetato:propionato pelo uso da própolis, investigações dos possíveis efeitos benéficos desta sobre a degradação de alimentos fibrosos devem ser realizadas, inclusive com a preocupação de identificar os possíveis compostos químicos da própolis relacionados a essa ação.

Tabela 1 - Efeito do extrato de própolis sobre o consumo de matéria seca (CMS), pH, concentrações de amônia, proteína microbiana e ácidos graxos voláteis (AGV) ruminais em novilhos e atividade específica de produção de amônia (AEPA), por microrganismos ruminais

Parâmetros	Tratamentos		EPM	P <
	Controle	Própolis		
CMS (kg/animal/dia)	10,88	10,52	1,487	0,870
pH ruminal	6,36	6,52	0,105	0,310
Amônia ruminal (mM)	4,89	5,56	0,343	0,220
Proteína microbiana (mg/L)	2997,20	3076,20	194,029	0,780
AEPA (nmol/mg PM/minuto)	11,65	8,10	0,373	0,001
% Acetato	72,40	74,90	1,28	0,210
% Propionato	18,00	16,20	0,92	0,220
% Butirato	9,50	8,80	0,59	0,410
Relação Acetato:Propionato	4,06	4,68	0,89	0,210
AGV Total (mM)	60,8a	94,8b	1,24	0,001

EPM = erro-padrão da média; QMR = quadrado médio do resíduo, P = nível significância.

Na Tabela 2 verifica-se que houve correlação positiva entre o pH e a concentração de acetato ruminal e a relação acetato:propionato, sendo esta correlação negativa para com a concentração de propionato. A atuação das bactérias formadoras de acetato é favorecida em pH mais elevado, contrariamente à atuação das formadoras de propionato, que dependem de menores valores de pH para seu crescimento ótimo. Russell & Dombrowski (1980) observaram que as bactérias ruminais fibrolíticas *Ruminococcus albus*, *R. flavefaciens* e *Fibrobacter succinogenes*, produtoras de acetato, apresentam crescimento parcialmente inibido em pH 6,0-6,1 e completamente inibido em valores de pH abaixo de 5,9, valores inferiores aos observados no presente trabalho.

Ao contrário do efeito do pH, a própolis não interferiu nas proporções dos AGV's, entretanto, a própolis apresentou alta correlação positiva com a concentração total de AGV e alta correlação negativa com a AEPA, confirmando os resultados apresentados na Tabela 1.

Tabela 2 - Correlação entre tratamento (0 = controle; 1 = própolis), pH e ácidos graxos voláteis no líquido ruminal¹

Correlação	Tratamento	pH	% Ac	% Pr	% But	AGVt	A:P
pH	0,42						
% Ac	0,49	0,92					
% Pr	-0,49	-0,93	-0,93				
% But	-0,34	-0,59	-0,79	0,50			
AGVt	0,94	0,32	0,41	-0,36	-0,38		
A:P	0,50	0,91	0,96	-0,99	-0,60	0,37	
AEPA	-0,94	-0,26	-0,33	0,31	0,26	-0,84	-0,31

1: Ac = acetato; Pr = propionato; But = butirato; AGVt = AGV total, A:P = relação acetato:propionato. AEPA= atividade específica de produção de amônia.

Conclusões

A própolis foi eficiente em inibir a atividade de desaminação de aminoácidos tanto *in vitro* quanto *in vivo* pelos microrganismos ruminais, resultados de grande interesse ao nutricionista de ruminantes, haja vista ser a proteína o nutriente mais oneroso da dieta desses animais e ser de fundamental valia que parte desse nutriente escape da fermentação pela microbiota ruminal, possibilitando acentuar a melhoria da eficiência produtiva dos ruminantes.

Embora não tenha alterado a proporcionalidade entre os AGV's, a própolis aumentou a concentração total dos mesmos, o que, em linhas gerais, confere aos ruminantes, por serem os AGV's a principal fonte de energia, maior possibilidade de se manterem e produzirem a partir de uma mesma dieta.

Há necessidade de mais pesquisas para verificar o efeito da própolis sobre a fermentação ruminal e sobre o desempenho dos animais, bem como a possível ocorrência de sinergismos com os lipídios e ionóforos.

Literatura Citada

- BARBOSA, N.G.S. **Fermentação da proteína dos alimentos por microrganismos ruminais *in vivo* e *in vitro* em função da acidez, fontes de proteína e ionóforos.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 76p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- BONVEHI, J.S.; COLL, F.V.; JORDÁ, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemists Society**, v.71, n.5, p.529-532, 1994.
- CHANEY, A.L.; MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemical**, v.8, p.130-132, 1962.
- CHEN, G.; RUSSELL, J.B. Effect of monensin and a protonophore on protein degradation, peptide accumulation, and deamination by mixed ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.69, p.2196-2203, 1991.
- DINIUS, D.A.; SIMPSON, M.E.; MARSH, P.B. Effect of monensin fed with forage on digestion and the ruminal ecosystem of steers. **Journal of Animal Science**, v.42, p.229-234, 1976.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.
- GONÇALVES, A.L.; LANA, R.P.; RODRIGUES, M.T. et al. Padrão nictemeral do pH ruminal e comportamento alimentar de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes relações volumoso:concentrado. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1886-1892, 2001.
- GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade “*in vitro*” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais.** Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1995. 18p. Monografia (Graduação em Zootecnia) - Universidade Federal da Bahia, 1995.
- HINO, T.; RUSSELL, J.B. Relative contributions of ruminal bacteria and protozoa to the degradation of protein *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.64, p.261-270, 1986.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B. Effect of forage quality and monensin on the ruminal fermentation of fistulated cows fed continuously at a constant intake. **Journal of Animal Science**, v.75, p.224-229, 1997.

- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; Van AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998a.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.62, n.11, p.2230-2232, 1998b.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v.58, n.9, p.2-7, 2000.
- PINTO, M.S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2000
- RUSSELL, J.B.; DOMBROWSKI, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied Environmental Microbiology**, v.39, p.604-610, 1980.
- RUSSELL, J.B.; MARTIN, S.A. Effects of various methane inhibitors on the fermentation of amino acids by mixed rumen microorganisms in vitro. **Journal of Animal Science**, v.59, p.1329-1338, 1984.
- SPEARS, J.W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v.120, p.632-638, 1990.
- THORNTON, J.H.; OWENS, F.N. Monensin supplementation and in vivo methane production by steers. **Journal of Animal Science**, v.52, n.3, p.628-634, 1981.

- Van NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of rumen fermentation. In: **The rumen microbial ecosystem**. London: Elsevier Applied Animal Science, 1988. 387p.
- VARGAS, A.C.; POCAI, E.A.; FONTANA, F.Z. et al. Dados parciais do teste “in vitro” da atividade antibacteriana da própolis. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, 1.; CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 12., 1994, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. 160p.
- WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.99-105, 1998.
- YANG, C.-M.J.; RUSSELL, J.B. Effect of monensin on the specific activity of ammonia production by ruminal bacteria and disappearance of amino nitrogen from the rumen. **Applied Environmental Microbiology**, v.59, p.3250-3254, 1993.

Ação do Extrato de Própolis sobre a Fermentação *in Vitro* de Diferentes Alimentos pela Técnica de Produção de Gases

RESUMO - Dois experimentos foram realizados procurando-se avaliar a eficiência do extrato de própolis *in vitro* em inibir a produção de gases oriundos da fermentação ruminal de diferentes alimentos. No primeiro experimento, incubaram-se 100 mg de matéria seca de feno de brachiária moído, em ausência (0,2 mL de solução alcoólica a 70% em água) ou presença de 0,2 mL de extrato de própolis (extração de 3 g de própolis em pedra triturada para cada 10 mL de álcool a 70%, durante dez dias, posteriormente diluída para 50% da mesma). O extrato de própolis, quando comparado ao tratamento controle, reduziu a produção final total e a produção final de gases para carboidratos fibrosos. A taxa de digestão específica para carboidratos fibrosos e carboidratos não-fibrosos foi superior, quando se utilizou o extrato de própolis. A redução da produção total de gases pode ser atribuída ao efeito da própolis em aumentar a concentração molar de propionato, com conseqüente diminuição da relação acetato:propionato. No experimento 2, procurou-se avaliar diferentes diluições de extrato de própolis (0; 13,7; 33,3; e 66,7%), em analogia à monensina sódica, adicionada para atingir 5,0 μ M como concentração final nos tubos de incubação. Observou-se efeito significativo de tratamento, alimento e interação alimento:tratamento sobre o volume de gás proveniente dos carboidratos fibrosos e não fibrosos. Não houve efeito do menor nível de própolis (13,7%) sobre nenhuma das dietas avaliadas, tanto para volume final de gases oriundos dos carboidratos fibrosos quanto não fibrosos. Entretanto, o maior nível (66,7%) mostrou-se eficiente em todas as dietas, para ambos os carboidratos, inclusive suplantando a monensina, na maioria das vezes, quanto à menor produção final de gases.

Palavras-chave: própolis, fermentação ruminal, gases, ionóforos

Effect of the Propolis on the in Vitro Fermentation of Different Feedstuffs by the Technique of Gas Production

ABSTRACT - Two experiments were accomplished with the objective to evaluate the in vitro efficiency of the propolis extract to inhibit the gas productions from ruminal fermentation of different feeds. In the first experiment, 100 mg of ground brachiaria dry matter hay was incubated, in absence (0.2 mL of alcoholic solution at 70,0% in water) or presence of 0.2 mL of propolis extract (extraction of 3 g of propolis in triturated stone for each 10 mL of alcohol at 70%, for ten days, later on diluted for 50% of the same). The propolis extract, when compared to the control treatment, reduced the final total production and the final gas productions for fiber carbohydrates. The specific digestion rate for fiber carbohydrates and non fiber carbohydrates was superior when the propolis extract was used. The reduction of the total gas productions could be attributed to the effect of the propolis in increasing the molar propionate concentration, with consequent decrease of the acetate:propionate ratio. In the experiment 2, the objective was to evaluate different dilutions of the propolis extract (0.0, 13.7, 33.3, and 66.7%), in analogy to the sodium monensin, added to reach 5,0 M as a final concentration in the incubation tubes. It was observed significant effect of treatment, feed and feed:treatment interaction on the gas volume from the fiber and non fiber carbohydrates. There was not effect of the smallest propolis level (13.7%) on none of the evaluated diets, for final gas volume as for the fiber as non fiber carbohydrate. However, the largest level (66.7%) shown efficient before all the diets, for both carbohydrates, besides supplanting the monensin most of the time with relation to the smallest final gas production.

Key Words: propolis, ruminal fermentation, gas, ionophore

Introdução

Em ruminantes, a fermentação de alimentos ingeridos produz ácidos graxos voláteis (AGV), amônia, gases (dióxido de carbono e metano) e células microbianas. Para o animal hospedeiro, os AGV's constituem a maior fonte de energia (65 a 75% da energia metabolizável ingerida). Entretanto, a produção de gases, dióxido de carbono e metano, representa grande perda de energia ingerida no alimento. Segundo Lana et al. (1998), a produção de gás metano pelas bactérias ruminais e intestinais (*Methanobrevibacter* spp. e *Methanomicrobium mobile*) corresponde a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido. Em adição, o gás metano, que é eliminado pelos ruminantes, por eructação, é um dos principais responsáveis pelo efeito estufa e pela destruição da camada de ozônio da atmosfera. Deve-se considerar que um bovino adulto chega a produzir mais de 400 litros de gás por dia (metano + dióxido de carbono), liberado no meio, principalmente por eructação; atualmente, o rebanho bovino mundial é constituído de mais de 1 bilhão de cabeças (ANUALPEC 2001). Conforme Crutzen et al. (1986), os ruminantes são responsáveis por 15% da emissão total de metano na atmosfera terrestre. Madigan et al. (1997) alertaram para o fato de os ruminantes serem os animais que mais contribuem para a emissão de metano na atmosfera.

Essa produção de gases no rúmen está intimamente relacionada com a produção de AGV. A fermentação de carboidratos e proteínas, que resulta em produção de AGV no rúmen, é acompanhada pela produção de hidrogênio. Somente pequena parte deste hidrogênio é usada para crescimento microbiano e saturação de ácidos graxos de cadeia longa, mas a maior parte é utilizada por bactérias metanogênicas para produção de metano.

Manipulações da fermentação ruminal que priorizem o aumento da produção de propionato, a exemplo de aditivos ionóforos, implicam, conseqüentemente, na diminuição da produção de metano no rúmen, devido à existência, no ecossistema ruminal, de uma relação inversa entre a produção de metano e de ácido propiônico.

O mecanismo pelo qual se justifica essa relação inversa consiste em direcionar os hidrogênios e carbonos que estariam disponíveis para metanogênese, excedentes na produção de acetato, deslocando-os para a produção de propionato. Logo, uma das formas de atuação dos ionóforos seria inibir a ação das bactérias gram-positivas produtoras de acetato, mas não o crescimento das bactérias gram-negativas produtoras de succinato e propionato (Russel & Strobel, 1989). Isto acarretaria diminuição na relação acetato:propionato no rúmen, promovendo redução na produção de metano e, conseqüentemente, aumentando a eficiência energética dos ruminantes.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a atividade antimicrobiana da própolis ocorre pela inibição de bactérias classificadas como gram-positivas (Ghisalberti, 1979; Langoni et al., 1994; Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Bankova et al., 1996; Park et al., 1998; Park et al., 2000; Pinto, 2000).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a eficiência da própolis em diminuir a produção de gases de três relações volumoso/concentrado incubadas *in vitro*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Setor de Bovinos e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

A cidade de Viçosa localiza-se na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, a 20°45' de Latitude Sul e 42°51' de Longitude Oeste e a altitude de 649m. De acordo com dados fornecidos pelo Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, o clima de Viçosa é subtropical, com inverno frio e seco e verão quente e úmido, sendo classificado como Cwa subtropical. Apresenta precipitação pluviométrica anual média de 1342 mm, sendo que 80% das chuvas caem entre os meses de outubro a março, período chuvoso, e os 20% restantes, entre os meses de

abril a setembro, período seco. A temperatura média das máximas é de 26,1°C; a média das mínimas, de 14°C; e a umidade relativa do ar, de 80%.

Na obtenção do extrato de própolis, foram utilizados 30 g de própolis bruta triturada para cada 100 mL de solução alcoólica hidratada (70,0%), por um período de 10 dias. Em seguida, foi feita a filtração em papel-filtro, obtendo-se a solução estoque.

Foi utilizado o líquido de rúmen de um animal recebendo forragem, coletado duas horas após o arração, filtrado em quatro camadas de gaze e transportado anaerobicamente para o laboratório. Na sequência, o líquido foi transferido para um erlenmeyer e mantido a 39°C (anaerobiose), para a separação da fase líquida ou inóculo (contendo bactérias) dos protozoários e das partículas dos alimentos (fases mais densa e o sobrenadante, respectivamente).

Inicialmente, procurou-se determinar, *in vitro*, a produção de gases pelos microrganismos ruminantes na ausência ou presença de própolis.

O preparo da amostra para a incubação *in vitro*, pela técnica de produção de gases foi realizado tomando-se 8,0 mL de solução tampão, 2,0 mL de inóculo e 0,2 mL de solução alcoólica a 70% ou da solução estoque de própolis, sendo esta última diluída para 50% da mesma. O alimento incubado foi o feno de brachiária (100 mg de feno triturado).

As leituras da pressão e volume dos gases foram realizadas por meio de um manômetro (0-1 kgf/cm²) acoplado a uma seringa (20 mL), conforme descrito por Malafaia et al. (1998), nos seguintes tempos: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 e 72 horas após o início da incubação. Para descontar o volume de gás oriundo do líquido de rúmen e da solução tampão, dois frascos foram incubados sem amostra (branco); dessa forma, para cada tempo de leitura, o volume de gás dos frascos com amostra foi subtraído do volume dos frascos sem amostra. Com o somatório do volume de gás para cada tempo de leitura, foram estabelecidas as curvas de produção cumulativa dos gases. A cinética da produção cumulativa dos gases foi analisada empregando-se o modelo logístico bicompartimental (Schofield et al., 1994):

$$V_t = V_{f_1} \{1 + \exp[2 + 4 \frac{\mu m_1}{V_{f_1}} (L - t)]\}^{-1} + V_{f_2} \{1 + \exp[2 + 4 \frac{\mu m_2}{V_{f_2}} (L - t)]\}^{-1}$$

em que: V_t = volume acumulado de gases no tempo “t” (mL); V_f = volume total de gases produzido em $t \rightarrow \infty$ (mL); μm = taxa máxima de produção de gases ($\text{mL} \cdot \text{h}^{-1}$); L = latência (h); t = tempo após o início da incubação (h); e “1” e “2” (subscritos) = indicadores referentes à cinética de produção de gases a partir de CF e CNF, respectivamente.

A razão $\mu m/V_f$, a qual apresenta a unidade h^{-1} , representa a taxa específica de digestão (k_d) do substrato (Schofield et al., 1994); neste estudo foi admitida como similar à taxa específica de crescimento microbiano, sob a pressuposição de relação diretamente proporcional entre o volume de gás produzido e a produção microbiana e o substrato digerido.

Para a realização dos ajustes dos modelos, foi utilizado o processo iterativo do algoritmo de Marquadt, implantado no software Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG (Euclides, 1993).

Na seqüência, procurou-se determinar a produção de gases *in vitro*, em função dos diferentes níveis de própolis e concentrado na dieta.

O preparo da amostra para a incubação *in vitro* pela técnica de produção de gases foi realizado tomando-se 8,0 mL de solução tampão, 2,0 mL de inóculo e 0,2 mL de solução alcoólica a 70% ou da solução estoque de própolis, sendo esta última diluída em três níveis (16,7; 33,3; e 66,7%). Nos tratamentos contendo a monensina, esta foi adicionada para atingir 5,0 μM como concentração final nos tubos de incubação.

Os seguintes alimentos foram incubados, procurando-se perfazer um total de 50 mg de NDT na dieta: 100 mg de gramínea fresca picada (Dieta 1); 50 mg gramínea fresca picada + 31,5 mg de amido de milho (Dieta 2); e 63 mg de amido de milho (Dieta 3).

As leituras de pressão e volume dos gases foram realizadas conforme descrito

anteriormente.

Para realização dos ajustes dos modelos, foi utilizado o processo iterativo do algoritmo de Marquadt, implantado no software Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG (Euclides, 1993).

Resultados e Discussão

Verifica-se, na Tabela 1, que o extrato de própolis, quando comparado ao tratamento controle (solução alcoólica a 70%), reduziu a produção final total e a produção final de gases para carboidratos fibrosos. Verifica-se, ainda, que a taxa de digestão específica para carboidratos fibrosos e carboidratos não-fibrosos foi superior, quando se utilizou o extrato de própolis. Assumindo a pressuposição de Schofield et al. (1994) de que a taxa de digestão específica (taxa de produção de gás) se correlaciona de forma direta e positiva com a taxa de crescimento microbiano, pode-se inferir que a própolis estimulou o crescimento microbiano. A redução no volume final de gases foi atribuída, provavelmente, ao fato de a própolis ter possibilitado a “conservação de carbono no meio”. Essa conservação de carbono no rúmen, em linhas gerais, é decorrência do aumento da concentração molar de propionato (3 carbonos) no rúmen, em detrimento de diminuição da concentração de acetato (2 carbonos). As substâncias ionóforas têm a propriedade de causar mudanças na relação entre esses dois ácidos, seja pela atuação inibitória sobre as bactérias fermentadoras de celulose (produtoras de acetato) (Spears, 1990), seja pela inibição de bactérias produtoras de formato e H_2 , precursores do gás metano; são mudanças nos produtos finais de fermentação que resultam no aumento do conteúdo de energia líquida dos alimentos. A melhora na eficiência alimentar dos ruminantes pode ser resultante da economia dessa energia advinda da incorporação dos carbonos e hidrogênios ao propionato, que seriam lançados na atmosfera na forma de gás (CO_2 e metano), principalmente via eructação (ruminação). Sabe-se, ainda que o propionato é o principal substrato precursor de glicose pela gliconeogênese no

fígado. Em níveis ou fases de produção em que a glicose advinda da fermentação de carboidratos não-fibrosos no intestino delgado não é suficiente para atender às exigências de produção animal, a exemplo de vacas em período de transição (esses animais têm consumo reduzido nessa fase), maior produção de propionato ruminal pode, além de assegurar o suprimento de glicose via gliconeogênese, evitar que maior quantidade de aminoácidos seja utilizada para formação de glicose, em razão destes serem os principais precursores de nova glicose na falta de propionato. Evitar que aminoácidos sejam utilizados para esse fim equivale obter economia de energia e, conseqüentemente, economia nos custos de produção, uma vez que o aumento de conteúdo protéico da dieta visando fornecer mais esqueletos de carbono para gliconeogênese é mais caro e também aumenta o custo energético na excreção urinária de uréia.

Segundo Mirzoeva et al. (1997), a própolis e alguns de seus componentes possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora.

Tabela 1 - Produção de gases (volume final total-vf e volume final para carboidratos fibrosos-vfcf) e taxa de digestão específica de carboidratos fibrosos-Kcf e não fibrosos-Kcnf

Tratamento	Vf	Vfcf	Kcf	Kcnf
Extrato de própolis*	30,62b	19,67b	0,0235a	0,1692a
Solução alcóolica a 70%	33,75a	22,06a	0,0195b	0,1179b

* Extrato de própolis = Solução estoque (30 g de própolis bruta em 100 ml de solução alcóolica a 70% em água) diluída pela metade com a mesma solução.

a > b comparação entre tratamentos (P< 0,05).

Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem pelo teste F (P<0,05).

Uma vez constatada a eficiência da própolis em inibir a produção total de gases, a importância recai sobre o estudo de diferentes dosagens, em níveis econômicos, que resultariam na maior inibição, ainda, em analogia a outro ionóforo considerado suficientemente eficiente nessa propriedade (monensina). Pesquisas têm demonstrado que a monensina reduz a produção de metano (Lana & Russell, 1998) e, considerando que do total de gases produzidos na fermentação dos carboidratos pelos microrganismos ruminais, o metano corresponde a um terço do mesmo, evidencia-se que a monensina, assim como a própolis, reduz a produção de gases.

Os valores médios para volumes finais de gases produzidos a partir de carboidratos fibrosos e não-fibrosos são mostrados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente. Para ambas as variáveis foram observados efeitos significativos com relação a tratamento ($P < 0,05$), alimento ($P < 0,05$) e interação entre estas fontes ($P < 0,05$). Verifica-se, de maneira geral, que com o aumento da relação concentrado:volumoso, houve incremento na produção de gases provenientes dos carboidratos não-fibrosos, em detrimento aos carboidratos fibrosos ($P < 0,05$), devido à diminuição do teor de fibra, com o aumento do nível de concentrado.

Na Tabela 2 pode-se constatar que a própolis em solução estoque 66,7% foi mais eficiente em inibir a produção de gases dos carboidratos fibrosos, comparada aos outros tratamentos, inclusive monensina, quando incubada com a dieta 1 (100% do NDT advindo de alimento volumoso).

Quando se incubaram os alimentos da dieta 2 (50% do NDT advindo de volumoso e 50% de concentrado), a própolis em solução estoque 66,7% foi superior aos outros níveis de própolis e tratamento controle em inibir a produção de gases, igualando-se à monensina. Na incubação da dieta 3 (100% do NDT advindo do alimento concentrado), a própolis em solução estoque 33,3% foi suficiente para inibir a produção de gases em níveis de significância equiparados à monensina e à própolis a 66,7%.

Tabela 2 - Produção de gases (volume final para carboidratos fibrosos) de três relações volumoso/concentrado tratados com monensina e diferentes níveis de extratos de própolis

Alimento	Tratamentos				
	Controle	Pr(16,7%)	Pr(33,3%)	Pr(66,7%)	Monensina
Vol.	31,05aA	28,47aA	31,82aA	14,04cA	24,41bA
Vol./conc.	25,19aB	23,17aB	22,49aB	12,53bAB	14,29bB
Conc.	18,45aC	17,91aC	13,29bC	9,80bB	10,23bB

Controle = solução alcoólica a 70%, Pr (16,7; 3,3; e 66,7%) = Níveis de solução estoque de própolis (30 g de própolis bruta em 100 mL de solução alcoólica a 70% em água) adicionada à solução alcoólica para perfazer 100%.

Médias contendo letras desiguais, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem pelo teste SNK (P<0,05).

Com relação à produção de gases a partir de carboidratos não fibrosos (Tabela 3), a solução estoque a 33,7%, quando incubada com alimento volumoso, equiparou-se com a solução a 66,7% e monensina, sendo estes mais eficientes que o tratamento controle e 16,7%. Quando o nível de carboidratos não-fibrosos da dieta se elevou (dietas 2 e 3), maiores concentrações de própolis foram necessárias para causar a inibição da produção de gases.

Pode-se evidenciar, dessa forma, que não houve efeito do menor nível de própolis sobre as dietas avaliadas, para o volume final de gases advindos de carboidratos fibrosos e não-fibrosos. Evidencia-se, ainda, que o maior nível de própolis se mostrou eficiente diante de todas as dietas, para ambos os carboidratos, suplantando, muitas vezes, a monensina quanto à menor produção final de gases.

Tabela 3 - Produção de gases (volume final para carboidratos não-fibrosos) pela incubação de 100 mg de alimentos em três relações volumoso/concentrado, tratados com diferentes níveis de extrato de própolis e monensina

Alimento	Tratamentos				
	Controle	Pr(16,7%)	Pr(33,3%)	Pr(66,7%)	Monensina
Vol.	14,69 aA	14,54 aB	5,67 bC	7,29bB	4,68 bB
Vol./conc.	15,98 aA	16,84 aAB	12,96 aB	9,49 bB	12,98 aA
Conc.	16,73 abA	18,48 aA	18,39 aA	14,84 bA	16,20bA

Controle = solução alcoólica a 70%, Pr (16,7%, 3,3%, 66,7%) = Níveis de solução estoque de própolis (30 g de própolis bruta em 100 mL de solução alcoólica a 70% em água) adicionada à solução alcoólica para perfazer 100%.

Médias contendo letras desiguais, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem pelo teste SNK (P<0,05).

Na Tabela 4 pode-se verificar o efeito de tratamento sobre o volume final total de gases. Os tratamentos testando os níveis intermediário (33,3%) e superior de própolis (66,7%), oriundos da diluição da solução estoque de própolis (extração de 30 g de própolis em pedra triturada para cada 100 mL de álcool a 70%, durante dez dias), mostraram-se eficientes em inibir a produção final de gases, enquanto o nível inferior (16,7%) não resultou significância em relação ao controle.

Embora não se tenha domínio sobre as concentrações molares dos princípios ativos (principalmente flavonóides e cetoses) da própolis em cada tratamento, conquanto esse domínio ocorra com a monensina incubada (adicionada para atingir 5,0 μ M como concentração final nos tubos de incubação), fica demonstrada a potencialidade da própolis em inibir a produção de gases *in vitro*. O nível superior de própolis (solução a 66,7%) mostrou-se eficiente nas três relações volumoso:concentrado. Assim, esse nível torna-se um valor referencial para novos estudos, inclusive com a expectativa de possibilidade de domínio sobre as concentrações e tipos de princípios ativos da própolis utilizada.

Tabela 4 - Efeito de diferentes níveis de extrato de própolis e monensina sobre a produção total de gases após 72 horas de incubação de 100 mg de volumoso e concentrado em diferentes proporções

Tratamento	Volume final (Vf)
Controle	40,69A
Própolis 16,7%	39,80A
Própolis 33,3%	34,87B
Própolis 66,7%	22,66D
Monensina	27,60C

Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste SNK ($p < 0,05$).

Conclusões

A própolis foi eficiente em inibir a produção de gases *in vitro* pelos microrganismos ruminais. Somando-se ao fato de que a mesma possibilitou aumento da taxa de digestão específica dos carboidratos, concluiu-se que devem ser realizadas novas pesquisas que explorem a própolis como novo aditivo na nutrição de ruminantes.

Literatura Citada

- ANUALPEC 2001. Anuário da Pecuária Brasileira. Ed. Argos Comunicação.359p.
- BANKOVA, V., MARCUCCI, M.C., SIMOVA, S. et al. Antibacterial diterpenic acids from brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.51, n.5-6, p.277-280, 1996.
- CRUTZEN, P.J.; ASELMANN, I; SEILER, W. Methane production by domestics animals, wild ruminants, other herbivorous fauna and humans. *Tellus*, v.38B, p.271-284. 1986.
- EUCLYDES, R.F. **Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG x Guia do usuário**. Central de Processamento de Dados, Viçosa, MG. 1993.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84. 1979.
- GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1995. 18p. Monografia - Escola de Medicina Veterinária - Universidade Federal da Bahia, 1995.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; Van AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.C. et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* da propolis. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994, Rio Cuarto, Argentina. **Anais...** Rio Cuarto, Argentina: 1994. p.189-192.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8.ed. London: Prentice Hall, 1997. p.566.
- MALAFAIA, P.A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; VIEIRA, R.A.M. et al. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.2, p.370-380, 1998.
- MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.

- PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Rev. Microbiol.**, v.29, p.143-148, 1998.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v.58, n.9, p.3-7, 2000.
- PINTO, M.S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J. Minireview: effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.
- SPEARS, J.W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v.120, p.632-638, 1990.
- VARGAS, A.C.; POCAI, E.A.; FONTANA, F.Z. et al. Dados parciais do teste “in vitro” da atividade antibacteriana da própolis. In: Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, I & Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 12., 1994, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. 160p.

Ação da Própolis e da Monensina sobre o Consumo de Matéria Seca e a Fermentação Ruminal em Caprinos

RESUMO - Objetivou-se avaliar a ação da própolis *in vivo* sobre o consumo, a fermentação ruminal e atividade específica de produção de amônia (AEPA) em seis cabras estabeuladas. Esses animais, fistulados no rúmen, foram submetidos a uma dieta contendo 67% de silagem de milho e 33% de concentrado, fornecida ad libitum, três vezes ao dia (8, 12 e 16 h). Testaram-se níveis semanais crescentes de própolis (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 gramas de própolis/cabeça/dia), advindos da própolis bruta ou do extrato alcoólico a 70% em água. Para compor um terceiro tratamento, utilizaram-se níveis crescentes de monensina na forma de Rumensin® (0, 11, 22, 33, 44 e 55 mg de monensina/kg de matéria seca consumida). Os tratamentos com a presença de própolis e monensina não afetaram o consumo de matéria seca, o pH e a amônia ruminais. Entretanto, embora não-significativa, houve redução de 21,1 e 12,2% no consumo de matéria seca, respectivamente, para monensina e própolis bruta. Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre a AEPA. Observou-se, no entanto, tendência do extrato de própolis em suplantam a monensina em potencialidade para inibir a AEPA (19,7% mais eficiente) pelos microrganismos ruminais. Os tratamentos com própolis e monensina não afetaram os teores dos ácidos acético, propiônico e butírico no total de ácidos graxos no líquido ruminal. Entretanto, foi possível evidenciar redução do teor de acetato (14,6%) e aumento do propionato (44,53%), pelo uso da monensina em relação ao tratamento controle, e aumento do teor de propionato (24,8%), pelo uso da própolis bruta. De modo geral, a falta de efeito estatístico foi devida à limitação do número de animais.

Palavras-chave: própolis, monensina, consumo, fermentação ruminal, ionóforos

Effects of the Propolis on Dry Matter Intake and on the Ruminal Fermentation of Goats

ABSTRACT - The objective of this work was to evaluate the In vivo effect of propolis on the dry matter intake, the ruminal fermentation and specific activity of ammonia production (SAAP) using six confined goats. Those animals, rumen fistulated, were fed a diet with 67.0% corn silage and 33.0% of concentrate, ad libitum fed, three times a day (8 a.m., 12 a.m. and 4 p.m.). Crescent weekly levels of propolis were tested (0.0; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0; and 8.0 grams of propolis/head.day), from the crude propolis or from the ethanol extract at 70% in water. To compose a third treatment, crescent levels of monensin were used in the form of Rumensin® (0, 11, 22, 33, 44 and 55mg of monensin/kg of dry matter intake). The treatments with the propolis and monensin did not affect the dry matter intake, the pH and the ruminal ammonia concentration. However, although not significant, there was a reduction of 21.1 and 12.2% in the dry matter intake, respectively, for monensin and crude propolis. There was not significant effect of the treatments on SAAP. It was observed, however, tendency of the propolis extract in supplanting the monensin in potentiality to inhibit SAAP (19.7% more efficient) by the ruminal microorganisms. The treatments with propolis and monensin did not affect the concentrations of the acetic, propionic and butyric acids in the total of the volatile fat acids in the ruminal fluid. However, it was possible to evidence reduction of the acetate (14,6%) and increase of the propionate (44.53%) concentrations by the use of monensin in relation to the control treatment and increase of the propionate concentration (24.8%) by the use of the crude propolis. In general, the lack of statistical effect was due to the limitation of the number of animals.

Key Words: propolis, monensin, intake, ruminal fermentation, ionophoro

Introdução

Com base em resultados de pesquisas que revelam a própolis como agente antibacteriano, com especificidade sobre bactérias gram-positivas (Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Park et al., 1997), e como produto natural e relativamente atóxico (Burdock, 1998), resolveu-se avaliá-la como novo aditivo para ruminantes. Suas características vão de encontro às novas exigências de mercado de alimentos de origem animal que requisitam produtos, na origem, isentos de qualquer substância antibiótica. A própolis viria, assim, a competir com os antibióticos ionóforos, na função de alterar benéficamente a fermentação ruminal para obtenção de maiores produções animal. Estaria ainda, de forma indireta, reduzindo a poluição ambiental, por meio da redução das perdas por fermentação (metano e amônia).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a ação da própolis sobre o consumo de matéria seca e a fermentação ruminal em caprinos.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Setor de Bovinos e as análises laboratoriais, no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, MG.

A cidade de Viçosa localiza-se na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, a 20°45' de Latitude Sul e 42°51' de Longitude Oeste e altitude de 649 m. De acordo com dados fornecidos pelo Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, o clima de Viçosa é subtropical, com inverno frio e seco, e verão quente e úmido, sendo classificado como Cwa subtropical. Apresenta precipitação pluviométrica anual média de 1342 mm, sendo que 80% das chuvas caem entre os meses de outubro a março, período chuvoso, e os 20% restantes, entre os meses de

abril a setembro, período seco. A temperatura média das máximas é de 26,1°C; a média das mínimas, de 14°C; e a umidade relativa do ar, de 80%.

Na obtenção do extrato de própolis, foram utilizados 30 g de própolis bruta triturada para cada 100 mL de solução alcoólica hidratada (70,0%), por um período de 10 dias. Em seguida, foi feita a filtração em papel-filtro, obtendo-se a solução estoque.

Foram utilizadas seis cabras fistuladas no rúmen (52,67 kg de PV médio) recebendo dieta contendo 67% de silagem de milho e 33% de concentrado, fornecida, *ad libitum*, três vezes ao dia (8, 12 e 16 h) para assegurar estabilidade das condições ruminais.

A ração foi balanceada para atender as exigências nutricionais das cabras, de acordo com o NRC (2000). A composição da ração encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição percentual dos ingredientes utilizados na ração (%MS)

Alimento	Tratamentos 1, 2 e 3
Silagem de milho	67,2
Fubá de milho	15,5
Farelo de soja	12,4
Farelo de trigo	1,64
Farelo de algodão	1,64
Uréia + Sulfato de NH ₃	0,33
Núcleo mineral	1,31
NDT ¹	69,32
PB ¹	15,11
EE ¹	2,76

¹Valores calculados com base no banco de dados de composição de alimentos do Sistema Viçosa de Formulação de Rações (Lana, 2000); NDT = nutrientes digeríveis totais, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo.

O experimento consistiu de um período experimental de oito semanas. As duas primeiras semanas foram utilizadas para adaptação dos animais à dieta e às instalações, sendo as seis semanas subsequentes utilizadas para ofertar, a cada semana, níveis crescentes de própolis (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; e 8,0 gramas de própolis/cabeça/dia), advindos da própolis bruta ou do extrato alcoólico a 70% em água. Para compor um terceiro tratamento, utilizaram-se níveis semanais crescentes de monensina na forma de Rumensin® (0, 11, 22, 33, 44 e 55 mg de monensina/kg de matéria seca consumida).

Pesaram-se as respectivas doses diárias de própolis bruta triturada para cada animal e, em seguida, dividiu-se essa dose em três partes equivalentes para serem fornecidas em cada alimentação (três vezes ao dia). Já para facilitar a homogeneização do extrato de própolis na ração concentrada, água destilada foi adicionada à quantidade diária de solução estoque de própolis (30%P/V), suficiente para totalizar 45 mL de solução/dia/animal. A exemplo do realizado com a própolis bruta triturada, essa solução fora dividida em três partes iguais (15 mL cada) para serem, igualmente, adicionadas a cada trato do dia. Assim, sendo a dose diária/animal equivalente a 1,67 mL de solução estoque para suprir o animal com extrato proveniente de 0,5 gramas de própolis/dia, 43,33 mL de água destilada foram adicionados.

Diariamente, nos períodos de adaptação e de coletas, foram feitas pesagens e amostragens da silagem, do concentrado oferecido e das sobras. Após a amostragem, o material foi colocado em sacos plásticos, devidamente identificados e congelados a -2°C e, ao final de cada fase, descongelados e homogeneizados para se retirar uma amostra composta por animal/período, para posterior análise de matéria seca, segundo Silva (1990).

No sétimo dia de cada período experimental, o líquido de rúmen foi coletado às 8, 11, 14 e 17 h para análises de pH ruminal, amônia e AGV. Para determinação da AEPA, o líquido de rúmen foi coletado três horas após a primeira alimentação (8 h), filtrado em quatro camadas de gaze e transportado anaerobicamente para o

laboratório. Na seqüência, o líquido foi transferido para um erlenmayer e mantido a 39°C (anaerobiose), para separação da fase líquida (contendo bactérias) dos protozoários e das partículas dos alimentos (fases mais densa e o sobrenadante, respectivamente).

Realizaram-se análises de regressão para determinar o efeito de níveis de própolis e monensina sobre os parâmetros avaliados e teste de média para comparar os diferentes tratamentos (controle, própolis bruta, extrato de própolis e monensina). Esta análise contou com oito unidades experimentais (duas cabras por tratamento), em que se tirou a média dos níveis dos aditivos por cabra; no caso do controle, como as seis cabras passaram pelo primeiro período na ausência de aditivos, obtiveram-se duas médias de três cabras.

Resultados e Discussão

Não foi verificado efeito de níveis de aditivos sobre nenhum dos parâmetros analisados. Do mesmo modo, pelo teste de médias, não foi verificado nenhum efeito estatístico significativo de tratamentos (Tabela 1), provavelmente pelo pequeno número de unidades experimentais. Entretanto, embora com cautela, pode-se fazer algumas inferências, devido a alguns efeitos numéricos expressivos e ao fato desta linha de pesquisa ainda não possuir informações disponíveis, uma vez que apenas recentemente se iniciaram os primeiros trabalhos (Stradiotti Jr. et al., 2001).

Embora não-significativa, houve redução de 21,1 e 12,2% no consumo de matéria seca, respectivamente, para monensina e própolis bruta. Resultados de trabalhos com animais confinados, recebendo aditivos conservadores de carbono no trato gastro intestinal, têm demonstrado haver diminuição no consumo de matéria seca (Goodrich et al., 1984; Moss, 1994; Duff et al., 1994; Nagaraja et al., 1997). Esta diminuição no consumo evidencia o melhor aproveitamento da energia bruta disponível no alimento, quando estas substâncias não nutrientes, atuantes sobre bactérias gram-positivas, são adicionadas à dieta de ruminantes, suprimindo as

perdas calóricas, principalmente a partir da menor produção de gases, menor desaminação de aminoácidos e maior produção de propionato. Em face da pequena margem de lucro que tem incidido sobre a pecuária brasileira nos últimos anos (ANUALPEC, 1998) e da alimentação animal ser responsável pela maior cota nos custos da produção, o emprego, em níveis econômicos, de aditivos que venham a diminuir perdas energéticas na nutrição animal assume importância fundamental. Conforme Tamminga (1992), atualmente, o objetivo dos nutricionistas é desviar a energia perdida para produtos especializados como o leite e a carne.

Observa-se tendência do extrato de própolis em suplantiar a monensina em potencialidade para inibir a atividade de desaminação (19,7% mais eficiente) pelos microrganismos ruminais, embora a monensina tenha apresentado os menores valores ruminais de amônia. A utilização de produtos aditivos com tal potencialidade mostra-se fundamental na produção de ruminantes, haja vista o custo energético da excreção do excedente de amônia na forma de uréia (3 ATPs por mol de uréia).

Os tratamentos com própolis e monensina não afetaram ($P>0,05$) a proporção dos ácidos acético, propiônico e butírico no total de ácidos graxos no líquido ruminal. Entretanto, é possível evidenciar redução da produção de acetato (14,6%) e aumento da produção de propionato (44,53%), com conseqüente redução de 47,41% na relação acetato:propionato, quando se comparam os resultados do tratamento com monensina em relação ao tratamento controle. A própolis bruta aumentou em 24,8% a concentração molar de propionato no rúmen e diminuiu a relação acetato propionato em 17,24%.

O aumento na concentração molar de propionato no rúmen com o uso de aditivos que agem sobre algumas espécies de bactérias gram-positivas tem sido constatado em diversos trabalhos (Thornton & Owens, 1981; Spears, 1990). Esse aumento deriva, principalmente, do efeito sobre a população de bactérias gram-positivas produtoras de ácido acético (celulolíticas), formato e H₂, com conseqüente favorecimento da população das bactérias gram-negativas produtoras de propionato,

seja pela não ação bactericida sobre essas bactérias, seja pela maior disponibilidade de precursores de propionato no líquido ruminal, em decorrência da inibição da produção de metano. Por ser o propionato, entre os três principais AGV's, o único precursor para a gliconeogênese, muitas são as vantagens, tanto em questões produtivas quanto de saúde animal, que se extrai do aumento da sua concentração no ambiente ruminal. Esse aumento da produção de propionato e conversão à glicose no tecido hepático pode, por exemplo, reduzir a utilização de aminoácidos gliconeogênicos, deixando-os disponíveis para a síntese protéica, assim como evitar a incidência de cetose, de comum ocorrência em vacas, ovelhas e cabras em final de gestação e início de lactação. Esses animais, nesta fase, têm seu consumo diminuído, com simultâneo aumento das suas exigências energéticas. O efeito cascata, que inclui a mobilização de gordura, a produção de corpos cetônicos no fígado, com a metabolização diminuída e acúmulo desses corpos cetônicos; e uma lipidose hepática, característicos do processo de acetonemia, em decorrência de diminuição da atividade glicogênica (Barbosa & Barbosa, 1999), pode ser evitado com maior produção de propionato no rúmen. As vacas em lactação utilizam até 50% da sua demanda metabólica para formação de glicose a partir de uma produção endógena usando o propionato como substrato. Observa-se que o uso de aditivos que favorecem o aumento da concentração molar de propionato no rúmen tem permitido a diminuição da concentração de corpos cetônicos em vacas recém paridas, sendo, portanto, recomendados para a prevenção da cetose (Weiss et al., 1990; Lean et al., 1992).

Tabela 1 - Valores médios de consumo de matéria seca e parâmetros de fermentação ruminal em cabras secas, em função dos tratamentos

	Controle	Extrato Própolis	Própolis bruta	Monensina	EP	P <
CMS	0,90	1,03	0,79	0,71	0,15	0,52
pH	6,19	6,16	6,26	6,45	0,01	0,23
NH ₃ , mM	8,86	8,40	8,90	6,68	0,80	0,29
AEPA	24,71	30,75	35,05	38,29	4,17	0,26
Acetato, mM	55,73	55,18	54,32	47,62	9,62	0,92
Propionato, mM	12,60	10,97	15,72	18,21	2,59	0,34
Butirato, mM	3,53	3,04	3,15	3,39	0,70	0,95
AGV total, mM	71,87	69,80	72,79	69,21	12,53	0,99
A:P	4,64	5,63	3,84	2,44	0,68	0,11

CMS = kg/animal/dia; AEPA = nmol NH₃/mg proteína microbiana/minuto; EP = erro-padrão da média; P = nível significância.

Observa-se nas Figuras 1 e 2 que, embora tenha sido adotado o critério de três alimentações/dia para a manutenção da estabilidade ruminal, quanto aos parâmetros estudados, ocorreram alterações nos valores de pH e NH₃. O pH decresceu de forma linear, de valores em torno de 6,7, momentos antes da primeira alimentação do dia (8 h), para valores próximos a 5,8 na terceira coleta do dia (9 h após a 1ª alimentação). Gonçalves (2001) alimentou cabras em lactação quatro vezes ao dia, a cada seis horas, e verificou estabilidade ruminal ao longo das 24 horas, coletando-se amostras do líquido ruminal de hora em hora.

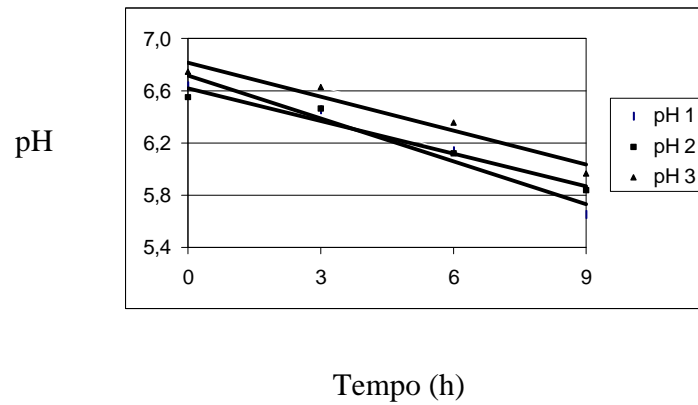


Figura 1 - Valores de pH, em função dos tratamentos e do tempo de coleta do líquido de rúmen de cabras fistuladas consumindo dietas contendo 32,8% de concentrado.

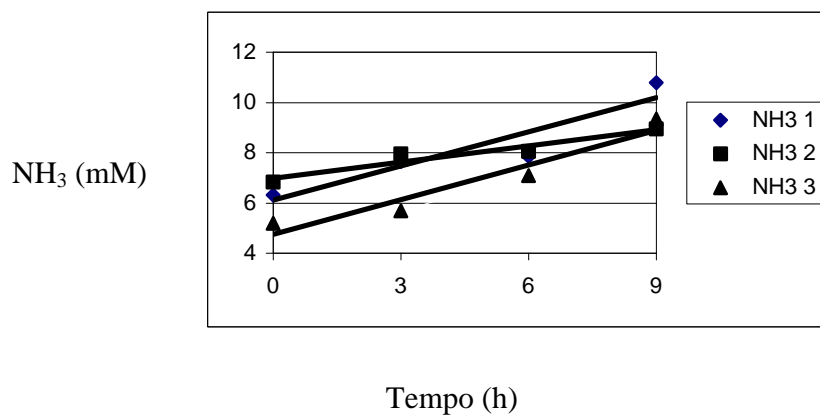


Figura 2 - Concentrações de NH₃ (mM), em função dos tratamentos e do tempo de coleta do líquido de rúmen de cabras fistuladas consumindo dietas contendo 32,8% de concentrado.

Verificam-se, pelos resultados dos artigos 1 e 2, efeitos altamente significativos da própolis *in vitro* sobre a inibição da produção de NH₃ e produção de gases. Entretanto, o mesmo não foi verificado nas condições *in vivo*, com exceção da atividade de desaminação (artigo 1), embora, neste caso, o efeito tenha sido menos acentuado que o uso da própolis em condições *in vitro*.

Lana & Russell (1996), comparando o efeito dos ionóforos monensina e lasalocida *in vitro* e *in vivo* pelo uso da técnica da perda de potássio intracelular, verificaram que a lasalocida foi mais potente inibidor microbiano *in vitro*, ao passo que a monensina foi mais eficiente *in vivo*. O maior efeito da lasalocida *in vitro* é devido a ela aderir firmemente tanto nas bactérias gram-positivas quanto nas gram-negativas, causando maior poder de inibição (Chow et al., 1994).

Segundo Chow et al. (1994), a lasalocida, por apresentar alta capacidade de adesão às partículas alimentares e ao epitélio ruminal, possivelmente, perde parcialmente seu efeito inibitório sobre os microrganismos ruminais (Chow et al., 1994). Provavelmente, isto pode estar ocorrendo também com a própolis, por algum fator desconhecido, seja pela adesão ao alimento, neutralização do efeito pela saliva, por algum microrganismo ruminal, ou pela taxa de diluição.

Conclusões

Faz-se importante dar continuidade às investigações da própolis como novo aditivo para ruminantes, uma vez que os resultados, embora não-significativos, apresentaram-se com tendências para menor consumo, menor atividade de desaminação e maior produção de propionato. Essas alterações são imprescindíveis à obtenção de melhor desempenho animal. Devem-se considerar, ainda, os resultados obtidos *in vitro* (artigos 1 e 2) para fermentação ruminal com o uso da própolis, por ser um produto natural e compatível com os antibióticos ionóforos.

Literatura Citada

- ANUALPEC **Bases pós-modernas para os novos tempos.** Ed. Argos Comunicação, 1998. p.18-9.
- BARBOSA, J.D.; BARBOSA, I.B.P. Cetose bovina. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.2, n.1, p.55-64, 1999
- BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.
- CHOW, J.M.; Van KESSEL, J.A.A.S.; RUSSELL, J.B. Binding of radiolabeled monensin and lasalocid to ruminal microorganisms and feed. **Journal of Animal Science**, v.72, p.1630-35, 1994.
- DUFF, G.C. et al. Effects of lasalocid and monensin plus tylosin on serum metabolic hormones and clinical chemistry profiles of beef steers fed a 90% concentrate diet. **Journal of Animal Science**, v.72, n.4, p.1049-58, 1994.
- GONÇALVES, A.L.; LANA, R.P.; RODRIGUES, M.T. et al. Padrão nictemeral do pH ruminal e comportamento alimentar de cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes relações volumoso:concentrado. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.6, p.1886-92, 2001.
- GOODRICH, T.B.; GARRETT, J.E.; GAST, D.R. et al. Influence of monensin on the performance of cattle. **Journal of Animal Science**, v.58, p.1484-1498, 1984.
- GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais.** Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1995. 18p. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal da Bahia, 1995.
- LANA, R.P. **Sistema Viçosa de Formulação de Rações.** Viçosa, MG: 2000. 60p.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J. B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4499-4503, 1996.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; Van AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.

- LEAN, I.J., BRUSS, M.L., BALDWIN, R.L. et al. Bovine ketosis: a review. II. biochemistry and prevention. **Veterinary Bulletin**, v.62, n.1, p.01-14, 1992.
- MOSS, A.R. Methane production by ruminants - reviews. **Nutrition Abstract and Review**, v.64, n.12, p.785-806, 1994. (Séries B)
- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Eds). **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic & professional, 1997. p.523-632.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of goats**. 6.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2000. 91p.
- SILVA, D.J. **Análise de alimentos** (métodos químicos e biológicos). 2.ed. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 160p.
- STRADIOTTI Jr., D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação da própolis sobre microorganismos ruminais desaminadores de aminoácidos e sobre alguns parâmetros de fermentação no rúmen. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37., 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2001.
- VARGAS, A.C., POCAI, E.A., FONTANA, F.Z. et al. Dados parciais do teste “in vitro” da atividade antibacteriana da própolis. In: Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, 1., Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 12., **Anais....** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. 160p.
- TAMMINGA, S. Nutrition management of dairy cows as a contribution to pollution control. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.1, p.345-357, 1992.
- WEISS, W.P.; AMIET, B.A. Effect of lasalocid on performance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.153-62, 1990.

3. RESUMO E CONCLUSÕES

A própolis foi eficiente em inibir a atividade de desaminação de aminoácidos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, pelos microrganismos ruminais, resultados de grande interesse ao nutricionista de ruminantes, em razão de a proteína ser o nutriente mais oneroso da dieta desses animais e ser de fundamental valia que parte desse nutriente escape da fermentação pela microbiota ruminal. Ainda *in vitro*, a própolis foi eficiente em inibir a produção de gases pelos microrganismos ruminais e possibilitar aumento da taxa de digestão específica dos carboidratos. A diminuição da AEPA e da produção de gases consiste em resultados que possibilitam acentuar a melhoria da eficiência produtiva dos ruminantes.

In vivo, foram observados aumento da concentração total de AGV's e tendências para menor consumo e maior produção de propionato. Essas alterações são imprescindíveis à obtenção de melhor desempenho animal.

Concluiu-se, assim, pela importância da realização de novas pesquisas que explorem a própolis como novo aditivo na nutrição de ruminantes.