

JULIANA SILVA DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DA MONENSINA E DA PRÓPOLIS PARA MANIPULAÇÃO E
FERMENTAÇÃO RUMINAL EM BOVINOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

O48u
2005

Oliveira, Juliana Silva de, 1981-
Utilização da monensina e da própolis para manipulação
e fermentação ruminal em bovinos. / Juliana Silva de
Oliveira. – Viçosa : UFV, 2005.
vii, 40f. : il. ; 29cm.

Orientador: Augusto César de Queiroz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Bovino de leite - Alimentação e rações. 2. Bovino de
leite - Registros de desempenho. 3. Rúmen – Fermentação.
4. Própolis na nutrição animal. 5. Monensina na nutrição de
animais. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.2085

JULIANA SILVA DE OLIVEIRA

**UTILIZAÇÃO DA MONENSINA E DA PRÓPOLIS PARA MANIPULAÇÃO E
FERMENTAÇÃO RUMINAL EM BOVINOS**

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

APROVADA: 26 de julho de 2005.

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Conselheiro)

Prof. José Maurício de Souza Campos
(Conselheiro)

Prof^a. Maria Ignez Leão

Prof. Antonio Bento Mancio

Prof. Augusto César de Queiroz
(Orientador)

Á Deus, por permitir que eu existisse e chegasse até aqui, mesmo com tantos diferentes caminhos que eu poderia seguir!

À minha mãe por ter participado diariamente na construção dessa dissertação e por ter me apoiado e suportado nos momentos mais difíceis desse trecho da minha vida, dando seu carinho e amor.

Ao meu pai, por tudo que representa para mim, e mesmo querendo que eu estivesse mais perto, nunca deixou de me apoiar.

Ao meu irmão pela amizade, preocupação, valores, e amor que sempre me deu.

À minha avó Francisca e as tias maternas que sempre me apoiaram neste caminho que quis seguir.

Ao meu Pai do Céu e a todas essas pessoas que citei:

Infelizmente nunca poderei retribuir por tudo que vocês fizeram por mim!

Por isso, como prova de meu amor eu dedico!

AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Cnpq) pela concessão de bolsa durante a realização do curso.

Ao professor Augusto César de Queiroz pela orientação, pela amizade e pelo grande professor que é.

Ao professor Hilário Cuquettto Mantovani pelos aconselhamentos, ensinamentos e atenção.

Ao professor José Maurício de Souza Campos pelos, também, ensinamentos e conselhos.

Aos professores Antonio Bento Mancio e Maria Ignez Leão pelos conselhos, colaboração e amizade.

Aos professores Sebastião de Campos Valadares Filho, Dilermando Miranda da Fonseca e Arnaldo Chaer Borges pelos conselhos e orientação.

Ao professor Dejair Message por toda contribuição para realização dos trabalhos.

Aos outros professores do Departamento de Zootecnia pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Zootecnia, da UEPE-GL, do Laboratório de Nutrição Animal e Departamento de Microbiologia pela ajuda e paciência.

Ao Mauro meu grande amigo e companheiro, pelo apoio, compreensão e carinho.

A todos os amigos e estagiários que me ajudaram na realização desses trabalhos, em especial ao: Adriano; Chiara; Josué; Fábio (não só pelo trabalho que me prestou, mas, também, pela amizade nos momentos difíceis); Rafael Veloso; Sr Zé Mariz; Estagiários (Rafael, Rodrigo, Hugo); e Estagiários do CNPGL.

Aos amigos que conquistei: Anderson; Rafaela; Regina; Jéferson, Dawson, Douglas (nº 1), Douglas (nº 2), Laura, Márcia (Góias); Márcia (Mato Grosso do Sul); Marlos, Vladimir, Vinícius, e Fernanda.

As queridas vacas (Hemácea, Hilda e Hilárea) que me ajudaram por demais, para que tudo corresse bem.

A todos que de uma forma ou de outra, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, para minha formação e crescimento profissional.

CONTEÚDO

INTRODUÇÃO	1
LITERATURA CITADA	4
Capítulo 01 – Atividade da Monensina e da Própolis sobre a Fermentação de Aminoácidos <i>In Vitro</i> pelos Microrganismos Ruminais	7
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1. Introdução	9
2. Material e Métodos	10
3. Resultados e Discussão	12
4. Conclusões	19
5. Literatura Citada.....	20
Capítulo 02 –Parâmetros Ruminais e Desempenho de Vacas Leiteiras Submetidas a Dietas Contendo Níveis Crescentes de Própolis	24
RESUMO	24
ABSTRACT	25
1. Introdução	26
2. Matéria l e Métodos	27
3. Resultados e Discussão	32
4. Conclusões	36
5. Literatura Citada.....	37

CONCLUSÕES GERAIS.....	40
-------------------------------	-----------

RESUMO

OLIVEIRA, Juliana Silva de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2005.

Utilização da monensina e da própolis para manipulação e fermentação ruminal em bovinos. Orientador: Augusto César de Queiroz. Conselheiros: Hilário Cuquetto Mantovani e José Maurício de Souza Campos.

Foram realizados dois estudos, com o objetivo de comparar os efeitos do extrato de própolis e da monensina sobre os microrganismos hiper produtores de amônia, e verificar os efeitos de níveis crescentes de extrato de própolis na dieta de vacas leiteiras sobre: (1) os parâmetros ruminais (pH, amônia, e atividade específica de produção de amônia [AEPA]) pela população microbiana, *in vitro*; e (2) parâmetros ruminais, consumo de matéria seca e produção e composição do leite. No primeiro estudo, utilizou-se líquido de rúmen de um novilho em pastejo, com adição de solução de tripticase, em três tratamentos (controle-C; monensina-M; e própolis-P). Foram feitas transferências diárias de inóculos para novos tubos com os mesmos tratamentos até o 10º dia (1ª fase) e, no 11º dia, cada tratamento foi combinado com os mesmos tratamentos da 1ª fase (C, M, P), totalizando nove combinações que continuaram a serem transferidos diariamente, sendo incubados durante mais nove dias (2ª fase). Do 1º ao 10º dia de incubação (1ª fase), a adição de ionóforo e da própolis a cultura evitaram o aumento da produção de amônia comparado ao controle. A própolis foi mais eficiente em decrescer a produção de amônia do que a monensina na 1ª fase; e diminui a produção de amônia e a AEPA na 2ª fase independente do tratamento presente na 1ª fase. A monensina foi tão eficiente quanto a própolis, na 2ª fase, quando os inibidores estavam ausentes na 1ª fase. Verificou-se, que ao remover os inibidores na 2ª fase, houve aumento na produção de amônia, quando o tratamento foi monensina, mas este efeito não foi detectado quando o tratamento era própolis, mantendo amônia em baixas concentrações. No segundo estudo, foram utilizadas três vacas Holandesas, fistuladas no rúmen, em delineamento completo, em dois blocos, com três períodos experimentais cada um. Os tratamentos constituíram de adição de três níveis de extrato etanólico de própolis (0, 34 e 68 mL/animal/dia) as dietas. As dietas foram compostas de 64,4% de silagem de milho e 35,6% de concentrado à base de milho e farelo de soja. Houve efeito de tratamentos sobre produção de leite, teor de gordura e proteína do leite, porcentagem de lactose no leite,

consumo de matéria seca, eficiência alimentar, concentração de NH_3 ruminal, às zero e três horas de coleta e pH às zero e três horas de coleta. Entretanto, não houve efeito de tratamento sobre a percentagem de gordura, proteína e extrato seco do leite, e AEPA pelas bactérias ruminais. O extrato etanólico de própolis adicionado à dieta aumenta o consumo de matéria seca e a eficiência alimentar e a produção de leite, e teor de gordura e proteína do leite, de vacas lactantes.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Juliana Silva de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, July 2005. **Use of monensin and propolis for ruminal manipulation and fermentation in cattle.** Adviser: Augusto César de Queiroz. Committee members: Hilário Cuquetto Mantovani and José Maurício de Souza Campos.

Two experiments were performed to compare the effects of ethanolic extract of propolis and monensin in hippuric ammonia producer microorganisms, and to observe the effects of levels propolis extract in the diets of dairy cows on: (1) ruminal parameters (ammonia, pH, and specific activity of ammonia production [SAAP] by the ruminal microbial population), *in vitro*, and (2) ruminal parameters, dry matter intake and production and composition of milk. In the first experiment, rumen fluid from a grazing steer was used, with addition of tripticase solution, in three treatments (control-C; monensin-M; and propolis-P). Inocula were transferred daily into new tubes up to the 10th day (first phase). On the 11th day, each treatment were combined with the same treatment in the 1st phase (C, M, P), totalizing nine combinations that continually to be daily transferred, being incubated during more nine days (second phase). From the 1st to the 10th days of incubation (1st phase), addition of ionophore and propolis to culture media prevented increases in ammonia production compared to the control. Propolis was more efficient than monensin in decreasing ammonia production in the 1st phase; and decreased ammonia production and SAAP in the 2nd phase regardless of the treatment present in 1st phase. Monensin was as much efficient as propolis in the 2nd phase, when the inhibitors were absent in the 1st phase. By removing the inhibitors in the 2nd phase, there was increase in ammonia production, when the treatment was monensin, but this effect was not observed when propolis was used, keeping ammonia at low concentrations. On the second experiment, three rumen fistuled dairy Holsteins cows were used, in switch-back design, in two blocks, with three experimental periods each one. The treatments consisted of the crescent levels ethanol extract of propolis addition (0, 34, 68 mL/animals/day) to the diets. The diets were composed by 64.4 corn silage and 35.6% concentrate based on ground corn and soybean meal. There was effect of treatments on milk production, content of fat and protein of the milk, percentage of milk lactose, dry matter intake, feed efficiency, ruminal NH₃ concentration at 0 and 3 hours of collection and pH at 0 and 3 hours of collection.

However, there was not effect of treatment on the percentage fat and protein, dry extract of milk, and SAAP by the ruminal bacterias. The ethanol extract of propolis added to the diet increase intake of dry matter and feed efficiency, and milk production, and content of fat and protein of milk of lactating dairy cows.

INTRODUÇÃO

Os herbívoros, com destaque aos ruminantes, são de grande importância à espécie humana, como fonte de nutrientes e ainda como força de trabalho. A abrangente utilização dos ruminantes, pela espécie humana, deve-se à vantagem inerente desses animais em relação aos outros: a habilidade de utilizar, como principal fonte de nutrientes, alimentos fibrosos e nitrogênio não protéico. Compostos abundantes no planeta, mas complexos, em que a capacidade de utilizá-los é difícil aos animais não-ruminantes.

Essa qualidade intrínseca só é possível devido à relação simbiótica existente entre os ruminantes e os microrganismos que habitam o rúmen dos mesmos, que são bactérias, protozoários e fungos. Assim, o animal proporciona um habitat adequado para o crescimento microbiano, com temperatura entre 39 a 40°C, anaerobiose, constante fluxo de alimentos e pH entre 5,5 e 7,0. Os microrganismos, em contrapartida, suprem o animal com os produtos finais da fermentação dos carboidratos, da degradação de proteínas e do nitrogênio não protéico e lipídeos. Porém, a fermentação e a degradação realizada por esses microrganismos propiciam a produção de compostos como metano e a amônia, que em excesso são indesejáveis, gerando perdas energéticas e protéicas, reduzindo a eficiência de produção e poluindo o meio ambiente.

O metano pode ser responsável pela perda energética de até 15% em relação ao alimento ingerido (Immig, 1996). A sua redução permite, então, melhor aproveitamento da energia, pois está associado ao aumento da produção de ácido propiônico. Este gás, também é um dos responsáveis pelo efeito estufa e pela destruição da camada de ozônio da estratosfera (Kirchgebner et al., 1995), de modo que sua redução atenua os danos causados à camada de ozônio e o calor global (Van Soest & Demeyer, 1996).

A amônia ruminal é proveniente de nitrogênio não-protéico da dieta, da degradação da proteína verdadeira dietética e da reciclagem via saliva ou difusão de uréia pela parede ruminal. Sua remoção é realizada via incorporação na proteína microbiana, passagem no trato posterior ou por absorção ruminal (Van Soest, 1994). Todavia, o excesso de desaminação de aminoácidos decorrente da fermentação microbiana ruminal, em sistemas intensivos de criação de bovinos, causa perda de nitrogênio e contamina o solo e os lençóis freáticos, devido ao aumento na excreção urinária.

A manipulação da fermentação ruminal tem sido empregada para aumentar a produtividade animal e reduzir a poluição ambiental, por meio da atenuação dessas perdas por amônia e metano. Há alguns anos, vários trabalhos tentam estabelecer adequada produção desses compostos, através de alterações na composição da dieta ou pelo uso de aditivos alimentares, a exemplo dos ionóforos poliéster carboxílicos, leveduras, fungos, antibióticos não-ionóforos, lipídeos insaturados, ácidos orgânicos, e mais recentemente, a própolis de abelha (Leopoldino, 2004).

Dentre esses aditivos, os ionóforos são os mais estudados. Somente os ionóforos monensina, lasalocida, salinomicina e laidomicina propionato são aprovados para uso em dietas de ruminantes (Nagaraja et al., 1997). Os ionóforos reduzem a produção de amônia pela inibição de uma população de bactérias gram-positivas, fermentadoras de aminoácidos e hiper produtoras de amônia, como as espécies *Peptostreptococcus anaerobius* C, *Clostridium sticklandii* SR e *Clostridium aminophilum* F (Russell et al., 1988; Chen & Russell, 1989; Paster et al., 1993). O ionóforo monensina pode ainda ter efeito na redução das perdas de metano, proporcionado pelo aumento de propionato em relação ao acetato, por meio da inibição de bactérias formadoras de hidrogênio e de formato.

Entretanto, em vários países, os ionóforos já foram proibidos, e outros mais estão com prazos de proibição de uso marcados. Assim a própolis, sendo uma substância natural e relativamente atóxica (Burdock, 1998), vai de encontro às novas exigências de mercado de alimentos de origem animal, que requisitam produtos isentos de qualquer substância tóxica (Stradiotti Jr et al., 2001).

A própolis é produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera* a partir de resinas colhidas de diversas partes da planta, como troncos, brotos e botões florais (Costa & Oliveira, 2005). As abelhas utilizam a própolis, dentre outras funções, para defesa contra intempéries e inimigos naturais. A própolis apresenta cheiro característico, com coloração variável do verde-amarelado ao preto, e solúvel em álcool, éter, benzeno, acetona e outros. Os fatores como a ecologia vegetal da região onde foi coletada e até mesmo a variabilidade genética das rainhas, influenciam na composição química da própolis (Park et al., 1998). Suas propriedades terapêuticas, e atividades antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e antimicrobiana são conhecidas há mais de cinco mil anos. Outras propriedades farmacológicas e biológicas têm sido descritas por vários autores, incluindo regeneração de

tecidos, ação imuno-moduladora, ação hepato-protetora, ação antioxidante, anticárie, antifúngica, atividade citotóxica, entre outros (Marcucci, 1995).

Dependendo da origem, a própolis pode conter acima de 400 substâncias químicas com funções ainda desconhecidas (Costa & Oliveira, 2005). Os principais compostos identificados na própolis são álcoois, aldeídos, ésteres alifáticos e aromáticos, aminoácidos, ácidos aromáticos, flavonas, flavonóides, cetonas, terpenóides, esteróides e açúcares (Marcucci, 1995). Dentre as diversas substâncias, os efeitos terapêuticos são atribuídos aos diversos compostos fenólicos que a compõem. Destes, os flavonóides e os ésteres podem ser considerados os principais compostos antimicrobianos e antiinflamatórios (Kikuni & Schilcher, 1994).

Observações experimentais demonstram que a própolis apresenta significativa atividade antibacteriológica contra *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei* e *Proteus vulgaris*, devido a ação da galangina, uma flavona isolada de diferentes amostras de própolis a qual apresentou atividade bacteriostática (Moraes & Alves, 1993).

A própolis apresenta atividade antimicrobiana maior sobre bactérias gram-positivas do que bactérias gram-negativas (Mirzoeva et al., 1997). Estudos constataram a inibição do crescimento de bactérias gram-positivas, responsáveis pela incidência de mastite em bovinos leiteiros (Pinto, 2000). Sua adição à ração poderia, então, como ocorre com os ionóforos, reduzir a atividade de desaminação e a relação acetato:propionato ruminal, com conseqüentes reduções nas produções de uréia e metano.

Alguns trabalhos recentes, *in vitro* e *in vivo*, demonstram o efeito inibitório de extrato de própolis sobre os microrganismos ruminais, reduzindo a desaminação de aminoácidos (Stradiotti Jr et al., 2001). Em outros trabalhos, a própolis foi mais eficiente em reduzir *in vitro* a produção cumulativa de gases do que os ionóforos monensina e lasalocida (Stradiotti Jr et al., 2002b; e Leopoldino, 2004).

Entretanto, em pesquisas com adição de própolis bruta ou extrato de própolis na alimentação de cabras leiteiras não se verificou efeito de tratamento sobre o consumo de matéria seca e parâmetros de fermentação ruminal (Carmadelli et al., 2002; e Stradiotti Jr et al., 2002a). Ocorreu apenas tendências de diminuição na concentração de amônia ruminal, e aumento na concentração de propionato, além de diminuição da relação

acetato:propionato nos tratamentos com extrato de própolis ou própolis bruta (Carmadelli et al., 2002; e Stradiotti Jr et al., 2002b).

Assim, são necessárias mais pesquisas com o intuito de elucidar o efeito da própolis sobre os microrganismos ruminais, como também, seu efeito em níveis maiores e sobre o desempenho produtivo de outros ruminantes. Como consequência, ter-se-á como possível alternativa de aditivo de manipulação ruminal, um produto natural e atóxico, que melhore o desempenho animal, sem trazer riscos à saúde humana.

Este trabalho teve por objetivo verificar os efeitos *in vitro* do extrato de própolis sobre os microrganismos produtores de amônia, em comparação com o ionóforo monensina, bem como determinar os parâmetros ruminais (pH, amônia, e atividade específica de desaminação) de vacas leiteiras com níveis crescentes de extrato de própolis na dieta.

LITERATURA CITADA

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.

CARMADELLI, M.M.L., LANA, R.P.L., RODRIGUES, M.T., et al. Efeito de óleo de soja e própolis na ração sobre a fermentação ruminal em caprinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Pernambuco: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2002]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA.

CHEN, G., RUSSELL, J.B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, p.1052-1057, 1989.

COSTA, S.C.C., OLIVEIRA, J.S. Própolis (Ed.) **Manual prático de criação de abelhas**. 1.ed. Aprenda Fácil: Viçosa, 2005. p.309-346.

IMMIG, I. The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.42, p.57-72, 1996.

KIKUNI, N.B., SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medicinal**, v.60, n.3, p.222-227, 1994.

- KIRCHGEBNER, M., WINDISCH, W.E., MULLER, H.L. Nutritional factors for the quantification of methane production. In: ENGELHARDT, W.V. et al. (Ed.) **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction, Proceedings of the eighth International Symposium on Ruminant Physiology, Stuttgart, Germany, 1995.** p.333-348.
- LEOPOLDINO, W. M. **Efeito da monensina, lasalocida, própolis, acidez e lipídios sobre a perda de potássio e fermentação de populações de bactérias do rúmen.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2004. 54p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia/Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- 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. **Microbiological Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological, properties and therapeutic activity. **Apologie**, v. 26, n.2, p. 83-89, 1995.
- MORAES, R.M., ALVES, M.L.T.M. **Própolis: Composição, propriedades e usos:** Associação Modelo de Apicultura, 1993. p.50.
- NAGAJARA, T. G., NEWBOLD, C. J., VAN NEVEL, C. J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. Hobson, P. N., Stewart, C. S. (Ed.) **The Rumen Microbial ecosystem.** Blackie Academic & professional: London, 1997. p. 523-632.
- PASTER, B.J., RUSSELL, J.B., YANG, C.-M.J. et al. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum*. sp. **International Journal Systematics of Bacteriology**, v.43, p.107-110, 1993.
- PARK, Y. K., KOO, H., IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces meslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiology**, v. 29, p. 143-148, 1998.
- PINTO, M. S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

- RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J., CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied Environmental Microbiology**, v.54, p.872-877. 1988.
- STRADIOTTI Jr, D., QUEIROZ, A. C., LANA, R.P., et al. Ação da própolis e da monensina sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38., 200, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2002]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA.
- STRADIOTTI Jr, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA; R.P. et al. Ação da própolis e da monensina sobre o consumo de matéria seca e parâmetros de fermentação ruminal em caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 39., 2002, Recife. **Anais...** Pernambuco: TechnoMEDIA, 2002. CD-ROM. Nutrição de ruminantes(a).
- STRADIOTTI Jr, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA; R.P. et al. Ação da própolis sobre microrganismos ruminais e sobre alguns parâmetros de fermentação no rúmen. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Pernambuco: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2002]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA(b).
- VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Control of rumen methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.42, p.73-97, 1996.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476p.

Capítulo 01 – Atividade da Monensina e da Própolis a Fermentação de Aminoácidos *In Vitro* pelos Microrganismos Ruminais

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi comparar os efeitos do extrato de própolis e da monensina sobre os microrganismos hiper produtores de amônia sobre: os parâmetros ruminais (pH, amônia, e atividade específica de produção de amônia [AEPA]) pela população microbiana, *in vitro*. Utilizou-se líquido de rúmen de um novilho em pastejo, com adição de solução de tripticase, em três tratamentos (controle-C; monensina-M; e própolis-P). Foram feitas transferências diárias de inóculos para novos tubos com os mesmos tratamentos até o 10^o dia (1^a fase) e, no 11^o dia, cada tratamento foi combinado com os mesmos tratamentos da 1^a fase (C, M, P), totalizando nove combinações que continuaram a serem transferidos diariamente, sendo incubados durante mais nove dias (2^a fase). Do 1^o ao 10^o dia de incubação (1^a fase), a adição de ionóforo e da própolis a cultura evitaram o aumento da produção de amônia comparado ao controle. A própolis foi mais eficiente em decrescer a produção de amônia do que a monensina na 1^a fase; e diminui a produção de amônia e a AEPA na 2^a fase independente do tratamento presente na 1^a fase. A monensina foi tão eficiente quanto a própolis, na 2^a-fase, quando os inibidores estavam ausentes na 1^a fase. Verificou-se, que ao remover os inibidores na 2^a fase, houve aumento na produção de amônia, quando o tratamento foi monensina, mas este efeito não foi detectado quando o tratamento era própolis, mantendo amônia em baixas concentrações. A própolis apresentou-se mais eficiente que a monensina em reduzir a produção de amônia de culturas de microrganismos ruminais em meio contendo caseína hidrolisada.

Palavras-chave: amônia, bactéria, monensina, própolis, rúmen

Chapter 01 - Use of the monensin and of the propolis for manipulation and fermentation ruminal in bovine

ABSTRACT - The objectives of this work to compare the effects of ethanolic extract of propolis and monensin in hippo ammonia producer microorganisms on ruminal parameters (ammonia, pH, and specific activity of ammonia production [SAAP] by the ruminal microbial population), *in vitro*. Rumen fluid from a grazing steer was used, with addition of tripticase solution, in three treatments (control-C; monensin-M; and propolis-P). Inocula were transferred daily into new tubes up to the 10th day (first phase). On the 11th day, each treatment were combined with the same treatment in the 1st phase (C, M, P), totalizing nine combinations that continually to be daily transferred , being incubated during more nine days (second phase). From the 1st to the 10th days of incubation (1st phase), addition of ionophore and propolis to culture media prevented increases in ammonia production compared to the control. Propolis was more efficient than monensin in decreasing ammonia production in the 1st phase; and decreased ammonia production and SAAP in the 2nd phase regardless of the treatment present in 1st phase. Monensin was as much efficient as propolis in the 2nd phase, when the inhibitors were absent in the 1st phase. By removing the inhibitors in the 2nd phase, there was increase in ammonia production, when the treatment was monensin, but this effect was not observed when propolis was used, keeping ammonia at low concentrations. The propolis apreseted to be more efficent in reducing the production of ammonia of ruminal microorganisms in incubations with casein hydrolysate.

Key Words: ammonia, bacteria, monensin, propolis, rumen

1. Introdução

O ionóforo monensina é um antibiótico que aumenta a eficiência de utilização de alimentos pelos ruminantes (Goodrich et al., 1984; Russell e Strobel, 1989). Ela atua nas trocas de sódio e prótons através do sistema antiporte em nível de membrana celular microbiana, mas também catalisa trocas de prótons e potássio.

Em uma revisão de pesquisas com um grande número de animais, Goodrich et al. (1984) verificaram que a monensina melhora a eficiência alimentar de bovinos em confinamento em 7,5%, e melhora o ganho de peso de bovinos em pastagens em 13,5%, devido ao aumento da eficiência de utilização dos alimentos. Parte deste efeito é devido à diminuição na produção de amônia ruminal provocada pelo ionóforo (Dinius et al., 1976; Van Nevel e Demeyer, 1977). Entretanto, existe pouca informação sobre o efeito dos ionóforos no metabolismo ruminal de proteínas (Russell, 1991).

Russell et al. (1988) e Chen e Russell (1989) relataram que a monensina reduz a produção ruminal de amônia pela inibição da população de bactérias gram-positivas, fermentadoras obrigatórias de aminoácidos e com alta capacidade de produção de amônia, como exemplo as espécies *Peptostreptococcus anaerobius* C, *Clostridium sticklandii* SR e *Clostridium aminophilum* F (Russell et al., 1988; Chen e Russell, 1989; e Paster et al., 1993).

Diversos trabalhos têm demonstrado que a própolis, resina proveniente de substâncias coletadas de plantas e misturadas com secreções de abelhas, também apresenta atividade antimicrobiana, inibindo bactérias gram-positivas (Ghisalberti, 1979; Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Park et al., 1998; Park et al., 2000). Foi constatada recentemente a inibição do crescimento de bactérias gram-positivas, responsáveis pela incidência de mastite em bovinos leiteiros, quando na sua aplicação (Pinto, 2000).

No entanto, existem poucos trabalhos sobre sua utilização como aditivo nutricional para ruminantes e 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*, iniba o crescimento de bactérias proteolíticas, assim como ocorre com os ionóforos (Hino e Russell, 1986) e, conseqüentemente, a desaminação e a proteólise (Russell e Martin, 1984).

Se o extrato de própolis for capaz de inibir definitivamente bactérias com alta capacidade de produção de amônia, então a atividade de desaminação não retornará aos níveis controles originais, mesmo após a remoção do extrato do meio de cultura. Por outro lado, se o extrato de própolis, como a monensina, causam apenas a inibição do transporte de aminoácidos ao nível de membrana, então, após remoção do extrato de própolis do meio de cultura, através de transferências diárias e sucessivas da cultura para meio estéril que não contenha própolis, ocorrerá o aumento de produção de amônia.

Este experimento objetivou estudar os efeitos *in vitro* do ionóforo monensina e do extrato de própolis sobre a fermentação ruminal de aminoácidos.

2. Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbicos do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa - UFV, em Viçosa, Minas Gerais. Utilizou-se um novilho fistulado no rúmen, mantido em pastagem de capim *Brachiária decumbens*, como doador de líquido de rúmen. O novilho foi alojado no Laboratório de Animais do Departamento de Zootecnia da UFV.

O líquido de rúmen foi coletado antes do arraçoamento da manhã, quando o objetivo era obter meio de cultura que apresentasse pH inicial elevado, e duas a três horas após o arraçoamento, para obtenção de inóculo contendo população microbiana ativa. O líquido foi coletado em diferentes locais no interior do rúmen, filtrado em quatro camadas de gaze, acondicionado em garrafa térmica com fechamento hermético e transportado imediatamente para o laboratório.

No preparo do meio de cultura, o líquido de rúmen foi centrifugado a 500 x *g*, por 15 minutos, em temperatura abaixo de 5°C, para sedimentação de partículas dos alimentos e protozoários. O sobrenadante foi transferido para frascos Erlenmeyer de 500 mL, autoclavado e armazenado em geladeira para posterior utilização.

Para obtenção do inóculo, o líquido de rúmen foi coletado no primeiro dia do experimento e mantido em banho-maria por 30 minutos, após as partículas alimentares flutuarem pelo acúmulo de gases e os protozoários sedimentarem, foi obtido, por sucção, o líquido na fase mediana do frasco, com alta concentração de bactérias.

Utilizou-se nas incubações como meio de cultura, 8,1 mL do líquido ruminal esterilizado e saturado com dióxido de carbono, acrescentado de 0,7 mL de inóculo, 1,0 mL de caseína hidrolisada (Trypticase; BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD) 15% (p/v) e 0,2 mL de etanol, contendo ou não monensina ou extrato de própolis. A monensina foi adicionada para atingir 5,0 μ M como concentração final no meio de cultura e a incubação foi realizada a 39°C. O extrato de própolis foi obtido utilizando-se 30 g de própolis moída em 100 mL de solução alcoólica (70% de álcool e 30% de água) durante 10 dias, seguido de filtração em papel de filtro (Stradiotti et al., 2002b). Foi feita, então, diluição do extrato com etanol, na proporção de 1:1. Foram feitas transferências diárias, em anaerobiose, até o décimo oitavo dia, de 0,7 mL do líquido (inóculo) para novos tubos de incubação com o meio de cultura estéril.

Na primeira fase, o experimento consistiu de três tratamentos (controle-C, monensina-M e própolis-P) e duas repetições até o décimo dia, totalizando seis tubos de incubação/dia. No décimo primeiro dia, iniciou-se a segunda fase, em que cada um dos três tratamentos serviu de inóculo para os mesmos tratamentos, em combinações diferentes. Como exemplo, o tratamento controle da primeira fase serviu de inóculo para um tratamento controle (CC), um monensina (CM) e um própolis (CP); e assim por adiante, totalizando nove combinações diferentes (CC, CM, CP, MC, MM, MP, PC, PM, PP) e 18 tubos de incubação/dia que foram incubados por mais nove dias.

Utilizaram-se seringas separadas para medição da solução de etanol e para coleta do meio de cultura em cada tratamento, evitando-se, assim, o efeito inibitório cruzado dos inibidores. Foram retiradas alíquotas do meio a zero e quatro horas após o início da incubação, nos dias 0, 3, 6, 9, 11, 12, 15 e 18 para determinação de proteína microbiana e amônia.

As amostras foram coletadas, colocadas em tubos eppendorf e centrifugadas na microcentrífuga a 5200 x g, por 10 minutos, sendo o sobrenadante congelado para análises de amônia. O pellet foi re-suspenso em solução salina (0,9% de NaCl), centrifugado e

separado do sobrenadante por duas vezes, e então re-suspenso em água destilada e congelado para a determinação de proteína microbiana. As análises de amônia foram feitas pelo método colorimétrico de Chaney e Marbach (1962) e as de proteína microbiana pelo método de Lowry et al. (1951), em duplicatas.

A atividade específica de produção de amônia (AEPA) ou atividade de desaminação pela população microbiana foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$AEPA = (\Delta NH_3 \times 1.000.000) / (\text{proteína microbiana} \times \text{tempo de incubação})$$

Em que:

AEPA = nmol NH₃/mg proteína microbiana/minuto;

ΔNH_3 = concentração final (4 h) - inicial de amônia (0 h), em mM;

Proteína microbiana = concentração inicial, em mg/L;

Tempo de incubação, em minutos (240 minutos).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento de regressão do Minitab (Ryan e Joiner, 1994) em função do período experimental na primeira fase, e na segunda fase as análises estatísticas foram realizadas pelo procedimento ANOVA do pacote estatístico SAS SYSTEM v 6.12 (1996), sendo feitos teste de média no décimo oitavo dia de incubação. A opção pelo método de regressão na primeira fase foi devido à incubação das amostras serem feitas somente em duplicata (3 tratamentos x 2 repetições), não sendo possível fazer teste de média. Por outro lado, a opção pelo teste de média na segunda fase foi para facilitar a interpretação dos resultados.

3. Resultados e Discussão

As Figuras 1, 2 e 3 apresentam, respectivamente, produção de amônia, concentração inicial de proteína microbiana e atividade de desaminação em 4 horas de incubação por microrganismos ruminais em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L) sem (controle) ou com adição de monensina ou própolis na primeira (1^o ao 10^o dia), e na segunda fase experimental (11^o ao 20^o dia).

Na primeira fase (1^o ao 10^o dia) houve efeito de tempo ($P<0,01$) e interação quadrática de tempo x tratamento ($P<0,10$) sobre a produção de amônia, onde a própolis inibiu a produção da mesma e a monensina causou inibição inicial, mas não evitou o aumento da produção com o passar dos dias de incubação.

O efeito da monensina em reduzir a produção de amônia foi verificado anteriormente *in vitro* (Russell et al., 1988; Chen & Russell, 1989; Cunha, 1999) e *in vivo* (Yang & Russell, 1993; Krause & Russell, 1996). A redução da produção de amônia pelos microrganismos ruminais, através da própolis, confirma os primeiros resultados observados com uso da própolis *in vitro* e *in vivo* por Stradiotti Jr. et al. (2001). Estas observações apresentam implicação prática, pois se há menor produção de amônia, tem maior acúmulo de peptídeos e aminoácidos no rúmen favorecendo o maior fluxo dos mesmos para o intestino delgado, com menores perdas ruminais das proteínas (Russell et al., 1988; Chen & Russell, 1989).

O tratamento monensina, apesar da menor produção de amônia quando comparado ao controle, não conseguiu manter essa produção ao longo do tempo. Esse resultado pode estar indicando uma reação diferente dos microrganismos ruminais de clima tropical aos ionóforos.

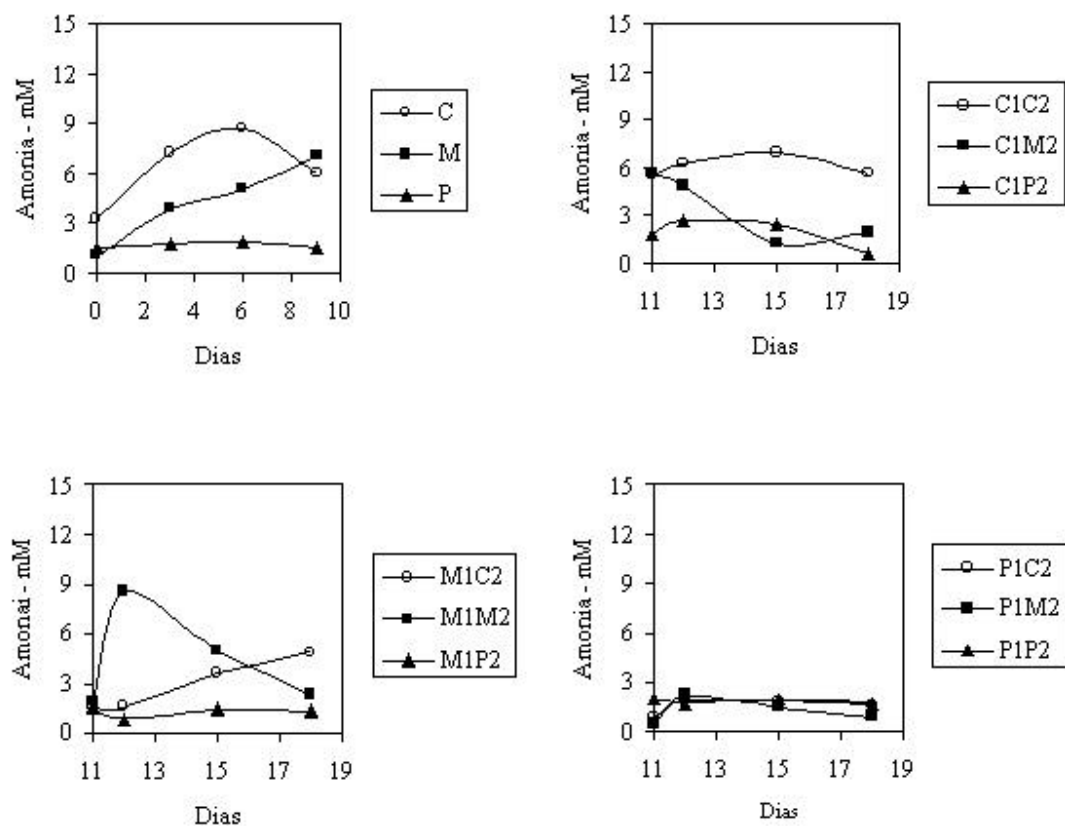


Figura 1 - Efeito de tratamentos (controle-C; monensina-M; e própolis-P) sobre a produção de amônia em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L), durante a primeira e segunda fase de incubação. As duplas de letras contidas nas legendas correspondem ao tratamento da primeira (1^o ao 10^o dia) e segunda fase experimental (11^o ao 18^o dia), respectivamente.

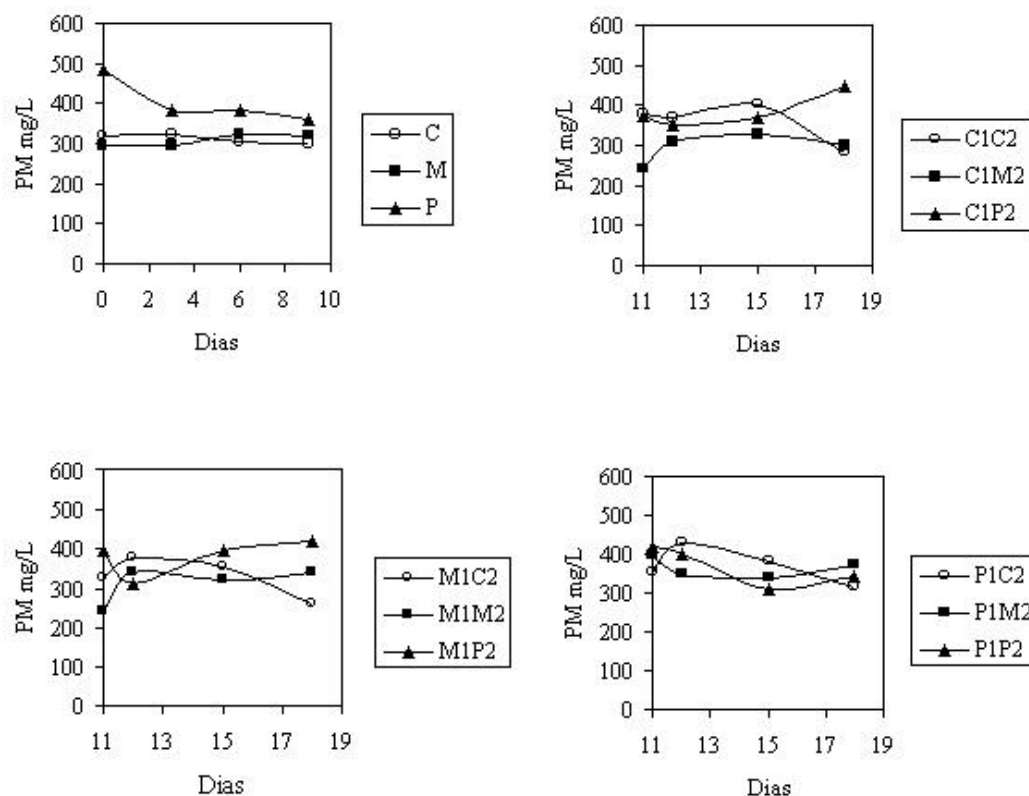


Figura 2 - Efeito de tratamentos (controle-C; monensina-M; e própolis-P) sobre concentração inicial de proteína microbiana em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L), durante a primeira e segunda fase de incubação. As duplas de letras contidas nas legendas correspondem ao tratamento da primeira (1^o ao 10^o dia) e segunda fase experimental (11^o ao 18^o dia), respectivamente.

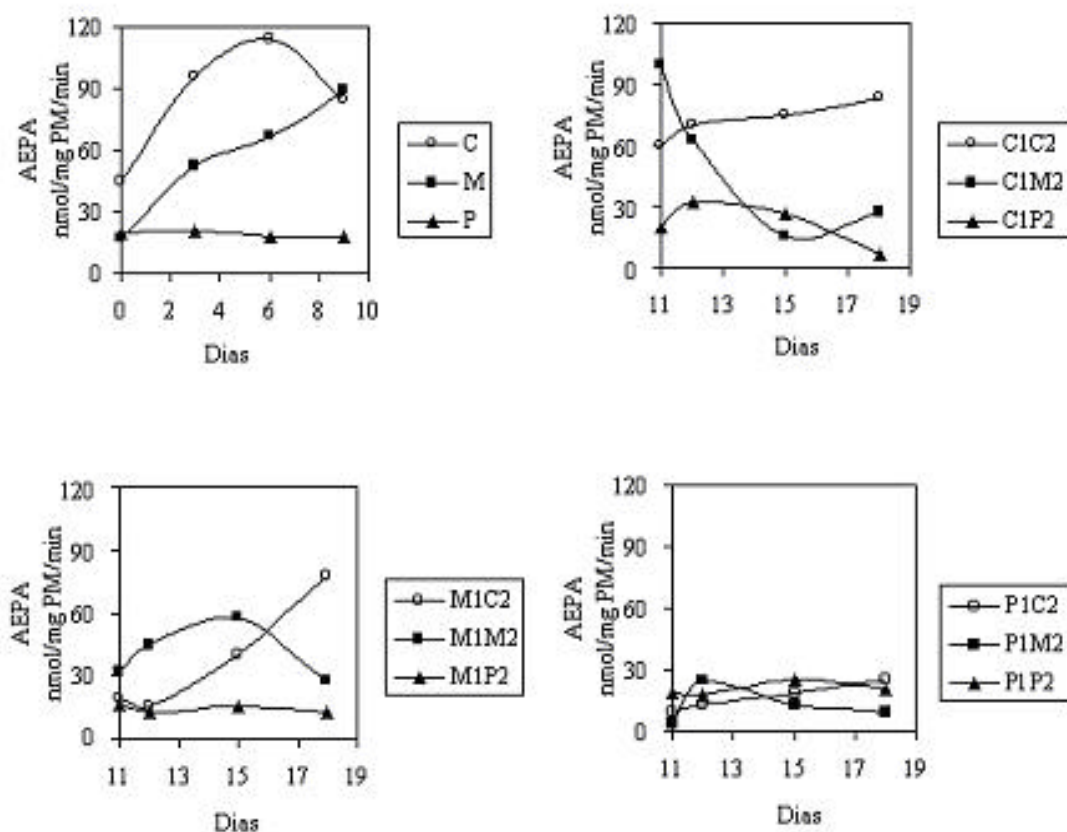


Figura 3 - Efeito de tratamentos (controle-C; monensina-M; e própolis-P) sobre a atividade específica de produção de amônia por microrganismos ruminais em um meio contendo caseína hidrolisada (15 mg/L), durante a primeira e segunda fase de incubação. As duplas de letras contidas nas legendas correspondem ao tratamento da primeira (1^o ao 10^o dia) e segunda fase experimental (11^o ao 18^o dia), respectivamente.

Não houve efeito de tempo sobre a concentração inicial de proteína microbiana na primeira fase, mas houve efeito de tratamento ($P < 0,01$), onde o tratamento com própolis apresentou uma maior concentração de proteína microbiana. O ionóforo monensina não interferiu com o crescimento microbiano quando comparado ao controle.

Houve efeito de tempo ($P < 0,01$), tratamento ($P < 0,10$) e interação quadrática de tratamento x tempo ($P < 0,10$) na atividade de desaminação durante a primeira fase de incubação. A monensina e própolis inibiram a atividade específica de produção de amônia.

O efeito da monensina também foi verificado por Cunha (1999). No entanto, diferente da própolis, o ionóforo não conseguiu manter a atividade específica de produção de amônia em níveis baixos.

A própolis aparenta ter um maior efeito sobre os microrganismos ruminais produtores de amônia do que a monensina, considerando que a primeira conseguiu inibir de forma mais eficiente a produção de amônia. Entretanto, como esse ensaio foi realizado com uma população mista de bactérias ruminais, não se sabe qual são as verdadeiras bactérias sensíveis ao extrato de própolis. Para isso, são necessários estudos mais profundos e com populações isoladas de bactérias proteolíticas ruminais, com o intuito de verificar a sensibilidade de cada espécie ao extrato de própolis, e em especial, as populações de bactérias proteolíticas com alto poder de produção de amônia.

A Tabela 1 demonstra os resultados das análises estatísticas do 18º dia de incubação (2ª fase). Ao analisar a tabela 1, junto com os gráficos de produção de amônia, concentração inicial de proteína microbiana e atividade de desaminação, durante a segunda fase da incubação (11º ao 18º dia), considerando as populações de microrganismos ruminais mantidas na primeira fase (1º ao 10º dia) sob os tratamentos controle e monensina, verifica-se que houve maior produção de amônia quando os microrganismos ruminais eram mantidos na ausência de inibidores na segunda fase. A própolis foi mais eficiente em decrescer a produção de amônia e AEPA na segunda fase independente do tratamento presente na primeira fase; a monensina foi tão eficiente quanto a própolis, na segunda fase, quando os inibidores estavam ausentes na primeira fase.

Tabela 1 - Efeito do ionóforo monensina e a própolis sobre a fermentação de caseína hidrolisada (15 mg/L) por microrganismos ruminais, no 18º dia de incubação (2ª fase), após 17 dias de transferências diárias de inóculo em um meio contendo o tratamento controle (C), monensina (M) ou própolis (P)

1ª fase:	Controle			Monensina			Própolis			
2ª fase:	C	M	P	C	M	P	C	M	P	EP ^a
NH ₃ , mM	11,11a	6,14ed	5,54ef	10,23b	7,15c	5,91edf	5,84edf	5,35f	6,24d	0,18
Pmic ^b	288bc	298bc	449a	259c	339bac	423ba	313bc	349bac	345bac	34,3
AEPA ^c	82,9a	27,8b	6,2b	78,0a	27,5b	12,8b	22,0b	9,8b	20,9b	9,02

Médias seguidas de letras iguais nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

^aErro padrão da média.

^bProteína microbiana, mg/L.

^cAtividade específica de produção de amônia, em nmol NH₃/mg proteína microbiana/minuto.

Não houve efeito de tratamento da segunda fase sobre a concentração inicial de proteína microbiana ao longo do tempo. No entanto, os tratamentos que continham própolis na segunda fase, apresentaram todos, no 18º dia, as maiores concentrações de proteína microbiana. Este efeito pode está envolvido com melhor eficiência de conversão da proteína dietética em proteína microbiana, pela inibição da atividade de desaminação, e conseqüentemente do excesso de produção de amônia. A produção de amônia em concentrações que possam ser aproveitadas pelos microrganismos, que têm a amônia como fonte de nitrogênio, permite uma maior conversão da amônia do meio em proteína microbiana, através de uma maior eficiência na captação do nitrogênio amoniacal e conversão para nitrogênio protéico.

Os resultados verificados no presente trabalho, em que, ao se remover a monensina do meio de cultura, tem-se o aumento na produção de amônia, já havia sido descrito por Lana et al. (2002). Também, os resultados confirmam aqueles obtidos por Newbold & Wallace (1989), que observaram que culturas de *Prevotella ruminicola* reduziram a atividade de transporte de peptídeos, quando submetidos ao ionóforo tetronasina. A redução é devido aos ionóforos catalisarem o efluxo de potássio e influxo de sódio e prótons para o

interior da célula microbiana, ocorrendo gasto de ATP para evitar a acidificação intracelular (Russell, 1987). Como a difusão facilitada também atua no transporte de aminoácidos (Driessen et al., 1987; Chen & Russell, 1990), e essa não é afetada pelos ionóforos, não há inibição total do transporte de aminoácidos e nem da atividade de desaminação. Assim, o restabelecimento do transporte em sua capacidade total ocorre assim que os ionóforos são removidos do meio de cultura ou da alimentação animal.

Os tratamentos com própolis mantiveram, mesmo com a sua remoção do meio, baixa produção de amônia e AEPA. Esse fato sugere uma reconsideração sobre a forma de atuação desse inibidor, que poderá atuar de forma diferente dos ionóforos nos microrganismos ruminais, atingindo outros componentes celulares além da membrana celular. Mirzoeva et al. (1997) verificaram que a própolis apresenta mais efeito bactericida do que bacteriostático sobre *Bacillus subtilis*. Outros trabalhos suportam que a própolis além de conter componentes de ação similar aos ionóforos, atua inibindo a síntese de enzimas bacterianas, e a divisão celular (Kikuni & Schilcher, 1994). Além disso, a própolis pode ter um espectro de ação maior que a monensina, sendo capaz de atingir a população de bactérias *Clostridium aminophilum* e outros, de alta capacidade de produção de amônia e que são mais resistentes a monensina, como, também poderia atingir as bactérias gram-negativas, considerando que a própolis é gram-independente (Kikuni & Schilcher, 1994).

Mais pesquisas devem ser feitas com intuito de esclarecer o modo de ação do extrato de própolis e sua capacidade bactericida sobre populações isoladas do rúmen.

4. Conclusões

A própolis apresenta-se mais eficiente que a monensina em reduzir a produção de amônia de culturas de microrganismos ruminais em meio contendo caseína hidrolisada.

5. Literatura Citada

- BLADEN, H.A., BRYANT, M.P., DOETSCH, R.N. A study of bacterial species from the rumen which produce ammonia from protein hydrolyzate. **Applied and Environmental Microbiology**, v.9, p.175-180, 1961.
- CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.
- CHEN, G., RUSSELL, J.B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1052-1057, 1989.
- CHEN, G., RUSSELL, J.B. Transport and deamination of amino acids by a gram-positive, monensin sensitive ruminal bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, p.2186-2192, 1990.
- CUNHA, L. T. **Efeito da acidez e de ionóforos na degradação de proteínas por microrganismos ruminais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- DINIUS, D.A., SIMPSON, M.S., 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.
- DRIESSEN, A.J.M., JONG, S.D., KONINGS, W.N. Transport of branched-chain amino acids in membrane vesicles of *Streptococcus cremoris*. **Journal of Bacteriology**, v.169, p.5193-5200, 1987.
- GHISALBERT, E, L, Propolis: a review. **Bee Wordl**, v.60, p. 59-84, 1979.
- GOODRICH, R.D., 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, T. C. S. **Estudos preliminares sobre atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate de bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1995, 18p. Monografia – Escola de Medicina Veterinária /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.
- IMMIG, I. The rumen and hindgut as source of ruminant methanogenesis. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.42, p.57-72, 1996.
- KIKUNI, N.B., SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medicinal**, v.60, n.3, p.222-227, 1994.
- KRAUSE, D.O., RUSSELL, J.B. An rRNA approach for assessing the role of obligate amino acid-fermenting bacteria in ruminal amino acid degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.815-821, 1996.
- LANA, R.P., RUSSELL, J.B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria to ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, n.12, p.4499-4503, 1996.
- LANA, R.P.; OLIVEIRA, J.S.; BORGES, A.C. et al. Efeito da monensina e lasalocida sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n.2, p.724-730, 2002.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L. et al. 1951. 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. **Microbiological Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- NEWBOLD, C.J., WALLACE, R.J. Changes in the rumen bacterium, *Bacteroides rumenicola*, grown in the presence of the ionophore, tetracycline. **Journal of Animal Science**, v.2, p.452-453, 1989.
- PARK, Y. K., KOO, H., IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces meslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Microbiology**, v. 29, p. 143-148, 1998.

- PARK, Y. K., IKEGAKI, M., ALENCAR, S. M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem doce**, v. 58, n.9, p.3-7, 2000.
- PASTER, B.J., RUSSELL, J.B., YANG, C.-M.J. et al. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum*. sp. nov. **International Journal Systematica of Bacteriology**, v.43, p.107-110, 1993.
- PINTO, S.M. 1997. **Produção e composição química do leite de vacas holandesas no início da lactação alimentadas com diferentes fontes de lipídeos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1997, 74p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, 1997.
- POOS, M.I., HANSON, T.L., KLOPFENSTEIN, T.J. Monensin effects on diet digestibility, ruminal protein bypass and microbial protein synthesis. **Journal of Animal Science**, v. 48, p.1516-1524, 1979.
- PRESSMAN, B.C. 1976. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, v.45, p.501-530, 1976.
- RUSSELL, J.B., WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1503-1509, 1996.
- RUSSELL, J.B. Fermentation of peptides by *Bacterioides ruminicola* B₁₄. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.826-830, 1983.
- 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.
- RUSSELL, J.B. A proposed model of monensin action in inhibiting ruminal bacterial growth: effects on ion flux and proton motive force. **Journal of Animal Science**, v.64, p.1519-1525, 1987.
- RUSSELL, J.B. A re-examination of the amino acid sparing effect of ionophores. In: PROCEEDINGS OF THE GRAZING LIVESTOCK NUTRITION CONFERENCE, 1991, USDA-ARS and Department of Microbiology. Cornell University, 1991. p. 2-3.

- RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J. Minireview. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.
- RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J., CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.872-877, 1988.
- RYAN, B.F., JOINER, B.L. **Minitab handbook**. 3 ed. Belmont, CA: Duxbury Press, 1994. 448p.
- SAS-Statistical Analysis System. **SAS/STAT User's Guide**. Release 6.12. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA, 1996.
- VAN NEVEL, C.J., DEMEYER, D.I. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.251-257, 1977.
- VARGAS, A.C., POCAI, E.A., FONTANA, F.Z. et al. Dados parciais do teste "in vitro" da atividade anti-bacteriana da própolis. In: CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CONE SUL, I & CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 22 . **Anais...** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. p.160.
- 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 and Environmental Microbiology**, v.59, p.3250-3254, 1993.

Capítulo 02 - Efeito da Própolis sobre os Parâmetros Ruminais de Vacas Leiteiras

RESUMO - Foi objetivo desta pesquisa determinar os parâmetros ruminais (pH, amônia e atividade específica de produção de amônia pela população microbiana ruminal - AEPA) de vacas leiteiras em função de níveis crescentes de extrato de própolis na dieta. Foram utilizadas três vacas Holandesas lactantes, fistuladas no rúmen, em delineamento completo, em dois blocos, com três períodos experimentais cada um. As dietas foram compostas de 64,4% de silagem de milho e 35,6% de concentrado à base de milho moído e farelo de soja. Os tratamentos constituíram de adição de níveis crescentes de extrato etanólico de própolis (0, 34 e 68 mL/animal/dia) as dieta. O extrato de própolis foi obtido adicionando-se 30g de própolis bruta moída para cada 100 mL de álcool à 70% em água, durante 48 horas a 45°C, seguido de centrifugação a 2500 rpm durante cinco minutos. Para determinação do pH, concentração de amônia (NH₃) do líquido ruminal e AEPA, as amostras foram coletadas manualmente, via fístula e filtradas em gaze. A produção leiteira foi mensurada diariamente e amostras de leite e dos alimentos foram coletadas para determinação da composição química/bromatológica. Houve efeito de tratamentos sobre produção de leite, conteúdo de gordura e proteína do leite, percentagem de lactose no leite, consumo de matéria seca, eficiência alimentar, concentração de NH₃ ruminal às 0 e 3 horas de coleta e pH as 0 e 3 horas de coleta. Entretanto, não houve efeito de tratamento sobre a percentagem de gordura, proteína e extrato seco do leite, e AEPA de bactérias ruminais. O extrato etanólico de própolis adicionado à dieta aumenta o consumo de matéria seca, eficiência alimentar e a produção de leite, conteúdo de gordura e proteína do leite de vacas leiteiras lactantes.

Palavras-Chave: consumo, eficiência alimentar, leite, manipulação ruminal, microrganismos, rúmen

Chapter 02 – Effect of Bee Propolis on Ruminal Parameters of Dairy Cows

ABSTRACT - The objective of this study was to determine the ruminal parameters (ammonia, pH, and specific activity of ammonia production by the ruminal microbial population - SAAP) of dairy cows in function of levels of propolis extract in the diets. Three rumen fistuled dairy Holsteins cows were used, in switch-back design, in two blocks, with three experimental periods each one. The diets were composed by 64.4 corn silage and 35.6% concentrate based on ground corn and soybean meal. The treatments consisted of the crescent levels propolis extract addition (0, 34, 68 mL/animals/day) to the diets. The ethanol extract of propolis was obtained by the addition of 30g of ground crude propolis to 100 mL of 70% ethanol, during 48 hours at 45°C, following centrifugation at 2500 rpm during five minutes. For the determination of pH, ammonia concentration (NH₃) and SAAP samples were manually collected, via fistula and cheese close filtered. The milk production was daily measured and samples of milk and feed were collected for the determination of the chemical composition. There was effect of treatments on milk production, content of fat and protein of the milk, percentage of milk lactose, dry matter intake, feed efficiency, ruminal NH₃ concentration at 0 and 3 hours of collection and pH at 0 and 3 hours of collection. However, there was not effect of treatment on the percentage fat and protein, dry extract of milk, and SAAP by the ruminal microbial population. The ethanol extract of propolis added to the diet increase intake of dry matter and feed efficiency, and milk production, and content of fat and protein of milk of lactating dairy cows.

Key-Words: intake, manipulation ruminal, microorganisms, milk, rumen, feed efficiency

1. Introdução

A fermentação ruminal possibilita aos ruminantes aproveitar como fonte de nutrientes, compostos complexos incapazes de serem utilizados pelos monogástricos. Por outro lado, a produção excessiva de compostos como metano e a amônia, pelos microrganismos, é indesejável, considerando-se que perdas energéticas e protéicas reduzem a eficiência de produção, como também atuam poluindo o meio ambiente. A manipulação da fermentação ruminal, pela adição de própolis na dieta, poderia então diminuir essas condições indesejáveis.

A fermentação microbiana produz ácidos graxos voláteis (AGV) e gases, principalmente dióxido de carbono e metano, e possibilita, ainda, a síntese de aminoácidos e vitaminas, em que as células microbianas são a principal fonte desses nutrientes para o animal.

Dentre os produtos finais da fermentação, o metano pode ser responsável pela perda energética de 15% em relação ao alimento ingerido. Este gás é um dos responsáveis pelo efeito estufa e pela destruição da camada de ozônio da estratosfera (Kirchgebnner et al., 1995); portanto, quanto menor o valor desse gás liberado, menor seu efeito sobre o meio ambiente. Também, o excesso de desaminação de aminoácidos, decorrente da fermentação microbiana ruminal, causa perda nutricional e financeira, e contamina o solo e os lençóis freáticos, devido ao aumento na excreção urinária.

A manipulação da fermentação ruminal tem sido empregada para aumentar a produtividade animal e reduzir a poluição ambiental, por meio da atenuação dessas perdas por amônia e metano. Um dos exemplos é o efeito dos ionóforos, como a monensina, que reduz a produção de amônia pela inibição de uma população de bactérias gram-positivas, fermentadoras de aminoácidos, hiper produtoras de amônia, como exemplo as espécies *Peptostreptococcus anaerobius* C, *Clostridium sticklandii* SR e *Clostridium aminophilum* F (Russell et al., 1988; Chen & Russell, 1989; Paster et al., 1993). O ionóforo monensina pode ainda ter efeito na redução das perdas de metano, proporcionado pelo aumento de propionato em relação ao acetato, através da inibição de bactérias produtoras de metano.

A própolis é conhecida a mais de cinco mil anos tanto por suas propriedades terapêuticas, como também por sua atividade antiinflamatória, cicatrizante, anestésica e

antimicrobiana. A própolis apresenta atividade antimicrobiana principalmente sobre bactérias gram-positivas (Ghisalberti, 1979; Park et al., 2000). Sua adição à ração poderia, como ocorre com os ionóforos, reduzir a atividade de desaminação e a relação acetato:propionato ruminal, com conseqüentes reduções nas produções de uréia e metano. Já se verificou, *in vitro*, efeito inibitório do extrato de própolis sobre a desaminação de aminoácidos por microrganismos ruminais (Stradiotti Jr et al., 2001).

Se a própolis for capaz de inibir as bactérias produtoras de amônia e as produtoras de metano, conseqüentemente os parâmetros a serem testados serão modificados pela introdução do extrato de própolis na ração, a partir de um determinado nível, como será também modificada a atividade de desaminação, que será menor que o tratamento controle.

Assim, foi realizado este ensaio para determinar os parâmetros ruminais (pH, amônia, e atividade específica de desaminação) de vacas leiteiras com níveis crescentes de extrato de própolis na dieta.

2. Material e Métodos

O ensaio foi realizado na Unidade de Ensino, Pesquisa e Extensão em Gado de Leite (UEPE-GL), no período compreendido entre agosto e outubro de 2004, e as análises bromatológicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal, ambos do Departamento de Zootecnia. As análises de amônia (NH₃) ruminal e atividade específica de produção de amônia (AEPA) pela microbiota ruminal foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia. Todas as unidades e departamentos são pertencentes à Universidade Federal de 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. O clima de Viçosa é subtropical, com inverno frio e seco e verão quente e úmido, sendo classificado como Cwa subtropical. A precipitação pluviométrica anual média é de 1.342 mm. A temperatura média das máximas é de 26,1°C e das mínimas de 14°C, com umidade do ar de 80%.

Foram utilizadas três vacas de raça Holandesa, múltíparas, lactantes (com mais de dois meses de lactação), fistuladas no rúmen e com peso vivo médio de 588 kg, dispostas em delineamento completo 3x3 e dois blocos sucessivos (Gomes, 1985). Os animais receberam a mesma dieta, durante os seis períodos experimentais (três de cada bloco), composta de 64,4% de silagem de milho e 35,6% de concentrado à base de milho e farelo de soja (Tabela 1), conseqüentemente, a relação de concentrado e volumoso na matéria seca foi, em média, 36:64, respectivamente.

Os tratamentos consistiram de adição de níveis crescentes de extrato etanólico de própolis (0, 34 e 68 mL/animal/dia), conforme apresentado na Tabela 3. A definição dos níveis de própolis foi determinado à partir do maior nível de extrato de própolis fornecido na dieta de caprinos em trabalhos anteriores (Stradiotti jr et al., 2001, Stradiotti jr et al., 2002a, Stradiotti jr et al., 2002b e Carmadelli et al., 2002). A extração da própolis foi realizada de acordo com a técnica descrita por Pinto (2000), em que foi obtido o extrato etanólico de própolis utilizando-se 30 g de própolis bruta moída em 100mL de solução alcoólica (70% de álcool e 30% de água), colocado em temperatura de 45°C, durante 48 horas, sob agitação, seguido por centrifugação a 2.500 rpm por cinco minutos, para eliminação dos resíduos.

Tabela 1 - Proporção dos ingredientes (%MS) no concentrado oferecido nos três tratamentos

Alimento	Proporção de ingredientes (%MS)
Milho	45,58
Farelo de soja	19,24
Farelo de trigo	10,25
Farelo de algodão	19,45
Uréia + Sulfato de NH ₃	1,14
Núcleo mineral	4,33

Tabela 2 – Composição bromatológica (%MS) da silagem de milho, concentrado, e dieta total.

Item	Silagem de milho	Concentrado	Dieta total
Matéria seca	29,33	88,15	50,27
Matéria orgânica	95,66	94,86	95,38
Proteína bruta	5,16	24,01	13,71
Extrato etéreo	2,27	3,00	2,53
Fibra em detergente neutro ¹	50,44	10,01	36,05
Cinzas	4,34	5,13	4,62
Carboidratos não fibrosos	34,94	57,84	43,09
Carboidrato total	85,38	67,86	79,14

¹Fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína.

Os animais foram pesados antes de iniciar o ensaio, e colocados em baias individuais providas de bebedouros e comedouros. As dietas foram fornecidas *ad libitum*, de maneira que houvesse pelo menos 10% de sobras. Os primeiros sete dias foram utilizados para adaptação dos animais às baias e rações, sem que houvesse nenhum tratamento com própolis.

O ensaio consistiu de cinco dias de adaptação para cada nível de extrato etanólico de própolis, e dois dias de coleta de líquido ruminal e amostras de leite, volumoso e concentrado, durante seis períodos (três períodos experimentais por bloco), totalizando 42 dias.

Nos três dias iniciais de cada período, os animais foram alimentados duas vezes ao dia (07:30h e 16:00h), sendo que nos tratamentos com extrato de própolis, este foi adicionado na ração, nos dois horários, dividido em duas parcelas. Nos últimos quatro dias de cada período, os animais foram alimentados às 01:00, 7:00, 13:00 e 19:00 horas, para manter constantes as condições ruminais. O extrato de própolis foi adicionado em seus respectivos tratamentos em parcelas iguais, nos horários acima mencionados.

Para determinação do pH e concentração de amônia (NH₃) do líquido ruminal, as amostras foram coletadas manualmente, via fístula, e filtradas em gaze, as zero e três horas após a alimentação da manhã, nos dois últimos dias de cada período experimental. A leitura de pH foi efetuada em potenciômetro, e uma alíquota de 1,5 mL do líquido ruminal, de cada tratamento, foi colocada em tubos de microcentrífuga, centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, seguido do congelamento do sobrenadante para posterior análise da concentração de amônia pela técnica colorimétrica descrita por Chaney & Marbach (1962).

Na avaliação da AEPA (Atividade Específica de Produção de Amônia), o líquido ruminal em cada tratamento foi coletado três horas após a alimentação da manhã dos dois últimos dias de cada período experimental, acondicionado em frascos de vidro com tampas e colocado em caixa de isopor para transporte ao laboratório. As amostras ficaram em repouso, a 39°C, durante 30 minutos para que ocorresse decantação e separação de partículas de alimento. Em seguida, foram transferidos, em duplicata, 9 mL do líquido ruminal da parte mediana do frasco para tubos de incubação, e então, foi feita saturação com CO₂ e vedação dos frascos com rolhas de borracha.

No tempo zero, foi adicionado 1 mL de solução anaeróbia de caseína hidrolisada (15g/L de concentração final) em cada tubo, sendo estes incubados a 39°C por quatro horas. Coletaram-se, então, 1,5 mL do meio às 0 e 4 horas de incubação para análise de concentração de amônia, pela técnica descrita anteriormente. Na coleta de zero hora, congelou-se o pellet para posterior análise de proteína microbiana, pela técnica colorimétrica descrita por Lowry et al. (1951).

A AEPA foi determinada medindo-se a quantidade de NH₃ produzida por mg de proteína bacteriana por minuto (Lana & Russell, 1997), valendo-se da seguinte equação:

$$AEPA = (\Delta NH_3 \times 1.000.000) / (\text{proteína microbiana} \times \text{tempo de incubação})$$

Em que:

AEPA = nmol NH₃/mg proteína microbiana/minuto;

ΔNH_3 = concentração final (4h) – concentração inicial de amônia (0h), em mM;

Proteína microbiana = concentração inicial, em mg/L;

Tempo de incubação, em minutos (240 minutos).

A produção leiteira foi mensurada diariamente, sendo utilizado para as análises estatísticas os dois últimos dias de cada período. A produção de leite corrigida para 3,5% de gordura foi determinada através da fórmula de Sklan (1992). Amostras de leite retiradas no período matutino e vespertino, dos dois dias, foram utilizadas para determinação da composição (teores de lactose, extrato seco, proteína e gordura) do leite. Essas amostras foram colocadas em recipientes com conservante e enviadas para o Laboratório de Qualidade de Leite da Embrapa Gado de Leite-Juiz de Fora (MG) para a realização das respectivas análises mencionadas.

Em cada período foram coletadas amostras dos alimentos oferecidos às vacas (silagem, concentrado, e ingredientes do concentrado) para determinações do teor de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), cinzas, carboidratos não fibrosos e carboidrato total através das metodologias descritas por Silva (1998).

A eficiência alimentar foi obtida pela divisão da produção leiteira pelo consumo de matéria seca diário das vacas.

Foi utilizado teste de média para comparar os tratamentos, com diferentes níveis de extrato de própolis, sobre os parâmetros avaliados. As unidades experimentais utilizadas nas análises estatísticas consistiram das médias, por animal, dos dois dias de coleta, dos parâmetros analisados (consumo de matéria seca, produção de leite, composição do leite, eficiência alimentar, NH_3 , pH e AEPA), provenientes dos três tratamentos testados. As análises estatísticas foram feitas usando o procedimento proposto por Gomes (1985), para delineamentos completos em ensaios de dupla reversão.

Tabela 3 – Delineamento utilizado no experimento, de acordo com os tratamentos, períodos e blocos experimentais

BLOCO 1				BLOCO 2			
	1° P	2° P	3° P		1° P	2° P	3° P
Vaca 1	0	1	2	Vaca 1	1	2	0
Vaca 2	1	2	0	Vaca 2	0	1	2
Vaca 3	0	1	2	Vaca 3	1	2	0

*0 = Tratamento controle; 1 = Tratamento com 34,0 mL de extrato de própolis; e 2 = Tratamento com 68,0 mL de extrato de própolis.

3. Resultados e Discussão

Como o objetivo principal deste experimento foi verificar as possíveis modificações dos parâmetros ruminais de vacas alimentadas com diferentes níveis de extrato de própolis, as inferências sobre produção e composição do leite dos animais, nos respectivos tratamentos, servem apenas de complementação dos resultados, considerando que foram utilizados sete dias para cada período experimental. Um período curto para medições apuradas sobre modificações na produção e composição do leite de vacas leiteiras. Entretanto, como a resposta destes parâmetros, à adição de extrato de própolis na dieta, explica as respostas dos parâmetros ruminais, seus resultados se tornam importantes para a discussão do presente trabalho.

Na Tabela 4 estão expressos os resultados observados de produção de leite (PLEITE), produção de leite corrigido para 3,5% de gordura (PLEITE 3,5%) (Sklan et al.; 1992), consumo de matéria seca em percentagem de peso vivo (CMS), eficiência alimentar (EFA), composição do leite (GORD, %; PROT, %; LACT, %) e quantidade de gordura e proteína do leite (GORD, gramas e PROT, gramas) em função da utilização de extrato etanólico de própolis. Apesar das exigências protéicas dos animais não terem sido supridas, tanto a produção de leite quanto o consumo de matéria seca foram afetados pela presença de extrato etanólico de própolis. Os animais submetidos aos tratamentos com extrato de

própolis tiveram uma maior produção de leite quando comparado aos animais submetidos ao tratamento controle. O consumo de matéria seca das vacas do tratamento com 68 mL de extrato de própolis foi maior quando comparado as vacas do tratamento controle. O aumento do consumo de matéria seca pela inclusão de extrato etanólico de própolis na dieta de cabras leiteiras já havia sido verificado por Carmadelli (2003). Entretanto, os animais submetidos ao tratamento com 34 mL de extrato de própolis não diferiram seu consumo em relação aos animais do tratamento controle, explicando a melhor eficiência alimentar (EFA) das vacas submetidas à esse tratamento, sendo 3,2% superior ao valor observado nas vacas do tratamento controle.

Não houve efeito de tratamento em relação à percentagem dos componentes do leite. Estes resultados, também, foram semelhantes aos obtidos por Camardelli et al. (2003) e Stradiotti Jr et al. (2002a), exceto pela percentagem de lactose no leite, em que diferente dos trabalhos citados, houve diminuição, quando adicionado o maior nível de extrato etanólico de própolis na dieta dos animais. Entretanto, a quantidade de gordura e proteína total do leite foi afetada pela introdução de extrato de própolis na dieta. O teor de gordura do leite foi maior no tratamento com 68 mL de extrato de própolis, ocorrendo o mesmo em relação ao teor de proteína do leite.

Tabela 4 – Valores médios da produção diária de leite (PLEITE), consumo de matéria seca (CMS), eficiência alimentar (EFA), gordura do leite (GORD), proteína do leite (PROT), lactose do leite (LACT) e extrato seco total do leite (ES), em função dos tratamentos, erro padrão (EP) e coeficiente de variação (CV)

Item	Tratamento			EP	CV (%)
	CON ¹	EP-34 mL ²	EP-68 mL ³		
PLEITE, L/dia	25,59b	26,79a	26,92a	2,002	3,10
PLEITE 3,5% gord, L/dia	23,57b	25,16a	25,66a	1,951	5,49
CMS, %PV	3,14b	3,22ab	3,26a	0,111	2,27
EFA, L/kg	2,21b	2,28a	2,23ab	0,243	2,51
GORD, %	3,10a	3,20a	3,17a	0,150	3,08
GORD, gramas	769,39b	836,15ab	863,60a	67,693	7,52
PROT, %	3,82a	3,44a	3,51a	0,136	8,30
PROT, gramas	851,33b	909,90ab	942,27a	52,115	6,89
LACT, %	4,57a	4,52ab	4,37b	0,063	3,11
ES, %	12,32a	12,11a	12,11a	0,185	1,61

CON¹= controle; EP-34 mL²= adição de 34 mL de extrato etanólico de própolis na ração; EP-68mL³= adição de 68 mL de extrato etanólico de própolis na ração. Médias seguidas por uma mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Na Tabela 5 estão expressos as concentrações de amônia zero e três horas após a alimentação das vacas, atividade específica de produção de amônia (AEPA) pela população microbiana ruminal e pH as zero e três horas após alimentação das vacas, em função dos níveis de extrato etanólico de própolis. Observa-se que a concentração de amônia ruminal, três horas após a alimentação das vacas, foi superior nos animais submetidos ao tratamento de 34 mL de extrato etanólico de própolis, quando comparados com os outros (CON e EP-

68 mL). Este resultado é diferente daqueles obtidos por Oliveira (2004), em que a própolis foi capaz de inibir a produção de amônia ruminal, em incubações *in vitro* de populações de bactérias ruminais mistas. Por outro lado, Stradiotti Jr. et al. (2002b) e Camardelli et al. (2003) não verificaram efeito da própolis sobre a produção de amônia ruminal quando este foi adicionado na alimentação de cabras leiteiras.

Tabela 5 – Médias da concentração de amônia no líquido ruminal à zero (NH₃ (0h)) e três horas (NH₃ (3h)) pós-alimentação, atividade específica de produção de amônia (AEPA) e pH ruminal à zero (pH (0h)) e três horas (pH (3h)) pós-alimentação, em função dos tratamentos, erro padrão (EP) e coeficiente de variação (CV).

Item	Tratamento				
	CON ¹	EP-34 mL ²	EP-68 mL ³	EP	CV (%)
NH ₃ (0h), mg N/dL	11,65a	11,33a	10,96a	1,243	16,48
NH ₃ (3h), mg N/dL	10,68b	12,45a	10,09b	0,826	15,37
AEPA, Nmol NH ₃ /mg	36,71a	34,81a	36,99a	3,463	8,06
pH (0h)	6,58a	6,40b	6,50a	0,067	0,94
pH (3h)	6,12b	6,24ab	6,31a	0,071	1,93

CON¹= controle; EP-34 mL²= adição de 34 mL de extrato etanólico de própolis na ração; EP-68mL³= adição de 68 mL de extrato etanólico de própolis na ração. Médias seguidas por uma mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

O extrato etanólico de própolis não alterou a desaminação de aminoácidos pelos microrganismos ruminais. Isto já havia sido observado por Camardelli (2003), com cabras leiteiras, onde os valores da atividade de desaminação foram similares a este experimento. Porém, Stradiotti Jr. et al. (2001) verificou inibição da atividade específica de produção de amônia quando o extrato de própolis foi adicionado à dieta de bovinos fistulados no rúmen.

Os animais submetidos ao tratamento com 34 mL de extrato etanólico de própolis tiveram um menor pH do líquido ruminal imediatamente antes da alimentação (zero hora). Entretanto, a pequena magnitude de variação de pH entre os tratamentos (todos os tratamentos mantiveram seu pH acima de seis), antes e depois da alimentação dos animais, não permite utilizar o pH como parâmetro de modificações da população microbiana.

Segundo Leng (1990), em condições tropicais, são necessárias concentrações acima de 10 mg N/dL de N-amoniaco no líquido ruminal para que haja maximização da digestão ruminal de matéria seca. Todos os animais submetidos aos tratamentos apresentaram essa concentração no rúmen.

O maior concentração de amônia três horas após a alimentação das vacas do tratamento com 34 mL de extrato de própolis, associado à falta de efeito do extrato etanólico de própolis sobre a atividade desaminadora, ocorreu provavelmente devido ao incremento no consumo de matéria seca pelos animais submetidos a esse tratamento e, conseqüentemente, de proteína, suprimindo o efeito do extrato de própolis sobre esses parâmetros ruminais.

A maior produção de leite e eficiência alimentar das vacas submetidas aos tratamentos de extrato etanólico de própolis pode estar relacionada ao maior consumo de matéria seca. Com isso, mais pesquisas devem ser realizadas para comprovar o efeito da própolis sobre o estímulo ao consumo de alimentos e conseqüente aumento na produção de leite e eficiência alimentar.

4. Conclusões

O extrato etanólico de própolis aumentou o desempenho e a eficiência alimentar de vacas lactantes, quando adicionado à dieta.

5. Literatura Citada

- CARMADELLI, M.M.L., LANA, R.P.L., RODRIGUES, M.T., et al. Efeito de óleo de soja e própolis na ração sobre a fermentação ruminal em caprinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Pernambuco: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2002]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA.
- CAMARDELLI, M.M.L. **Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 2003. 63p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- CHANEY, A.L., MARBACH, E.P. Modified reagents for determination of urea and ammonia. **Clinical Chemistry**, v.8, p.130-132, 1962.
- CHEN, G., RUSSELL, J.B. More monensin-sensitive, ammonia-producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.1052-1057, 1989.
- GHISALBERT, E.L. Própolis: A review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. 11.ed. Piracicaba: Nobel, 1985. p.357-366.
- KIRCHGEBNER, M., WINDISCH, W.E., MULLER, H.L. Nutritional factors for the quantification of methane production. In: ENGELHARDT, W.V. et al. (ed). **Ruminant physiology: digestion, metabolism, growth and reproduction, Proceedings of the eighth International Symposium on Ruminant Physiology, Stuttgart, Germany**. 1995. p.333-348.
- LANA, R.P.; RUSSEL, 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.4499-4503, 1997.
- LENG, R.A. Factors affecting the utilization of “poor-quality” forages by ruminants particularly under tropical conditions. **Nutrition Research and Review**, v.3, n.3, p.277-303, 1990.

- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- OLIVEIRA, J. S.; LANA, R. P.; BORGES, A. C. et al. Efeito da monensina e extrato de própolis sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.504-510, 2004.
- ØRSKOV, E.R. Starch digestion and utilization in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.63, n.5, p.1624-1633, 1986.
- OWENS, F.N., GOESTSCH, A.L. Ruminal fermentation. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **The ruminant animal digestive physiology and nutrition**. Englewood cliffs: O & Books Inc, 1988. p.146-171.
- PARK, Y. K., IKEGAKI, M., ALENCAR, S. M. Classificação da própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem doce**, v. 8, n.9. p.3-7, 2000.
- PASTER, B.J., RUSSELL, J.B., YANG, C.-M.J. et al. Phylogeny of the ammonia-producing ruminal bacteria, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium sticklandii* and *Clostridium aminophilum*. sp. nov. **International Journal Systematica of Bacteriology**, v.43, p.107-110, 1993.
- PINTO, M. S. Efeito antimicrobiano de própolis verde do estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- RUSSELL, J.B., STROBEL, H.J., CHEN, G. The enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, p.872-877, 1988.
- SILVA, D.J **Análise de alimentos**. Universidade Federal de Viçosa - UFV, 1998. 165p.
- SKLAN, D. A note on production responses of lactating ewes to calcium soaps of fatty acids. **Animal Production**, v.55, p.288-291, 1992.

- STRADIOTTI Jr, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA; R.P. et al. Ação de extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Recife. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2001]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA.
- STRADIOTTI Jr, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA; R.P. et al. Ação da própolis e da monensina sobre o consumo de matéria seca e parâmetros de fermentação ruminal em caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 39., 2002, Recife. **Anais...** Pernambuco: TechnoMEDIA, 2002. CD-ROM. Nutrição de ruminantes(a).
- STRADIOTTI Jr, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA; R.P. et al. Ação da própolis sobre microrganismos ruminais e sobre alguns parâmetros de fermentação no rúmen. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002, Recife. **Anais...** Pernambuco: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [2002]. CD-ROM. Nutrição de ruminantes. TECHNOMEDIA(b).

CONCLUSÕES GERAIS

A própolis apresentou ser mais eficiente que a monensina em reduzir a produção de amônia de culturas de microrganismos ruminais *in vitro* em meio contendo caseína hidrolisada.

O extrato etanólico de própolis aumentou o desempenho e a eficiência alimentar de vacas lactantes, quando adicionado à dieta.

Os constituintes do leite, exceto a lactose, não são alterados pela inclusão do extrato etanólico de própolis na ração das vacas lactantes.