

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRÓPOLIS E MONENSINA SÓDICA EM DIETAS
VOLUMOSAS SOBRE A DIGESTIBILIDADE E
CARACTERÍSTICAS RUMINAIS DE BOVÍDEOS

Autora: Odimári Pricila Pires do Prado
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Maria Zeoula
Co-Orientador: Dr. Pedro Braga Arcuri

“Tese apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – área de concentração Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Julho–2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P896p Prado, Odimári Pricila Pires do
Própolis e monensina sódica em dietas volumosas sobre a digestibilidade e características ruminais de bovídeos / Odimári Pricila Pires do Prado. -- Maringá : [s.n.], 2008.
92 f. : il. color.

Orientadora : Prof. Dr. Lúcia Maria Zeoula.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Área de Concentração Produção Animal, 2008.

1. Nutrição animal - Ruminantes - Avaliação. 2. Nutrição animal - Ruminantes - Própolis - Digestibilidade. 3. Digestibilidade - Parâmetros ruminais. 4. Nutrição animal - Rumen - Microbiologia 5. Nutrição animal - Ruminantes - Isolamento de cepas bacterianas. 6. Nutrição animal - Digestibilidade - Aditivos. I. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 21.ed.636.2085

Vem de Ti, Senhor

Não tenho palavras pra agradecer a Tua bondade
Dia após dia me cercas com fidelidade
Nunca me deixes esquecer
Que tudo o que tenho, tudo o que sou
O que vier a ser, vem de Ti Senhor

Dependo de Ti, preciso de Ti
Sozinho, nada posso fazer.
Descanso em Ti, espero em Ti
Sozinho, nada posso fazer.

Nunca me deixes esquecer
Tudo o que tenho, tudo o que sou
O que vier a ser, vem de Ti Senhor.

(Ana Paula Valadão)

“Bendize, ó minha alma ao Senhor e tudo o
que há em mim bendiga o seu santo nome.
Bendize, ó minha alma ao Senhor e não te
esqueça de nenhum só dos seus benefícios”
Salmo 103:1-2

A

Deus pelo dom da vida e da saúde

Por que dEle e por Ele são todas as coisas

A Ele seja a honra e glória, para sempre

Aos

Meus pais: Guaraci e Odite,

Pelo incentivo, compreensão, sustento e amor

Aos

Meus irmãos: Ordaci e Oracir, cunhados: Marcos e Lucélia, sobrinhos: Ana

Gabriela, Marcos Emanuel, Mateus, Natália e Maria Eduarda

Por nunca me deixarem desanimar

Aos

Meus irmãos em Cristo em Maringá e Juiz de Fora

Pelo apoio, amizade, carinho, orações e suporte

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Cristo Jesus pelo amor demonstrado por mim na cruz, mesmo não sendo merecedora.

À Universidade Estadual de Maringá e EMBRAPA Gado de Leite –Juiz de fora por terem possibilitado desenvolver este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos e financiamento obtido.

À Profa. Doutora Lúcia Maria Zeoula, pela orientação, paciência, ensinamentos e amizade.

Ao Doutor Pedro Braga Arcuri, pela co-orientação, oportunidade de adquirir novos conhecimentos, apoio e amizade.

À Profa Doutora Lucimar Pontara Peres de Moura, à Profa Doutora Selma Lucy Franco e ao Prof Doutor Ivanor Nunes do Prado pelos ensinamentos, contribuições, parceria, incentivo e amizade.

À Msc. Marlice Ribeiro, ao Doutor Fernando César, ao funcionário da Embrapa José Luiz pela ajuda, ensinamentos e suporte no período de estágio na EMBRAPA.

Às minhas colegas de estágio no Laboratório de Microbiologia do Rúmen e amigas Sara Barbosa de Paiva, Juliana Alves Resende, Thaís Barros Rispoli, Sylvia, Ana Clarissa, Sarita e Alex.

Aos colegas de curso Ricardo Kazama, Sílvia Cristina Aguiar, Hanna Carla Cardoso Gomes, Guido Jacobi, Daiane Terezan Lopes, Roberto Cornelis Jonker pelo apoio e amizade.

Aos bolsistas de apoio técnico (CNPq) Márcia Aparecida Boza e Ezupério Salim da Silva, pela ajuda, incentivo, amizade e paciência.

À funcionária do laboratório Cleuza Volpato pelo auxílio da realização das análises.

Aos meus amigos e irmãos em Cristo de Juiz de Fora: Nádia, Priscila, Karine, Rosi, Edvaldo, Leci, Verberton, Lílian, Hadson, Samuel, Rafael, Regina, Felipe, Fernanda, Eliezer, Vilma, Luciene, e em especial a “Tia” Rute e “Tio” Ednaldo pelos bons momentos, amizade, hospitalidade e orações. Vocês sempre estarão em meu coração.

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

BIOGRAFIA

ODIMÁRI PRICILA PIRES DO PRADO, filha de Guaraci Dias do Prado e Odite Pires do Prado, nasceu em Cruzeiro d'Oeste, Paraná, no dia 29 de julho de 1980.

Em julho de 2003, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá.

No ano de 2003, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de nutrição de ruminantes.

Em março de 2005, iniciou o Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

No dia 11 do mês de agosto de 2005, submeteu-se à banca para a defesa da dissertação de mestrado.

Em 27 de março de 2008, submeteu-se à banca para apresentação do exame de qualificação do doutorado.

Em 14 de julho de 2008, submeteu-se à banca para defesa de tese de doutorado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
TABELAS DO APENDICE.....	xv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
I- INTRODUÇÃO.....	1
1.1-Uso de ionóforos em animais criados em pastejo.....	3
1.2-Atividade biológica da própolis.....	5
1.3-Uso da própolis em experimentação animal.....	8
1.4-Literatura citada.....	14
II- OBJETIVOS GERAIS.....	20
III- Isolamento e caracterização expedita morfológica, bioquímica e cinética de bactérias ruminais tolerantes aos produtos contendo própolis	21
Resumo.....	21
Abstract.....	22
Introdução.....	23
Material e Métodos.....	24
Resultados e discussão.....	27
Conclusões.....	38
Literatura citada.....	38
IV- Digestibilidade e parâmetros ruminais de dieta à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos.....	40
Resumo.....	40
Abstract.....	41

	Introdução.....	42
	Material e Métodos.....	43
	Resultados e discussão.....	46
	Conclusões.....	58
	Literatura citada.....	58
V-	Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bubalinos.....	63
	Resumo.....	63
	Abstract.....	64
	Introdução.....	65
	Material e Métodos.....	66
	Resultados e discussão.....	69
	Conclusões.....	83
	Literatura citada.....	83
VI-	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87
VII-	APÊNDICES	88

LISTA DE TABELAS

	Página
Isolamento e caracterização expedita morfológica, bioquímica e cinética de bactérias ruminais tolerantes aos produtos contendo própolis	
TABELA 1. Composição química das dietas experimentais.....	26
TABELA 2 - Percentagem de cepas puras de bactérias tolerantes ao produto à base de própolis LLOS ¹ em relação às tentativas de repicagem de colônias isoladas obtidas de conteúdo ruminal de vacas alimentadas com dietas experimentais	28
TABELA 3- Percentagem de cepas puras de bactérias que apresentaram coloração Gram positiva e Gram negativa tolerantes aos diferentes produtos LLOS ¹ , à base de própolis, incubadas nas diferentes proporções de volumoso: concentrado.....	30
TABELA 4. Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos, expressa em percentagem de cepas de bactérias tolerantes aos diferentes produtos à base de própolis LLOS ¹ , obtidas de animais alimentados com diferentes dietas (100% de silagem de milho e 50% silagem de milho:50% concentrado).....	32
Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos	
TABELA 1.Composição bromatológica e percentual dos alimentos e dieta experimental.....	43
TABELA 2. Média, probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) para os consumos de matéria seca (MS) e nutrientes em bovinos alimentados com dieta à base de volumoso e diferentes aditivos contendo própolis LLOS ¹ e monensina.....	47
TABELA 3. Média, probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) para os coeficientes de digestibilidade aparente total e parcial em bovinos	

alimentados com dietas à base de volumoso e diferentes aditivos contendo própolis LLOS³ e monensina.....49

TABELA 4. Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal e produção de ácidos graxos voláteis para bovinos alimentados com dieta volumosa contendo ou não aditivos à base de própolis LLOS¹ e monensina54

TABELA 5. Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de taxa de passagem de líquido (TP, %/hora), tempo de retenção (TeR, horas), taxa de reciclagem (TRec, vezes/dia), taxa de fluxo líquido (TF, litros/hora) e volume ruminal (VR, litros e % do peso corporal) para produtos LLOS contendo própolis e monensina em bovinos56

TABELA 6. Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de teores de MO, nitrogênio total e purinas de microrganismos ruminais, ingestões de matéria orgânica (IMO) e nitrogênio (IN), fluxos de MO, MO microbiana, N microbiano (N-mic), N não microbiano (NN-Mic) no omaso, MO aparentemente degradável no rúmen (MOADR) e MO verdadeiramente degradável no rúmen (MOVDR) e eficiência de síntese microbiana aparente e verdadeira para tratamentos contendo ou não produto LLOS à base de própolis e monensina em bovinos57

Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bubalinos

TABELA 1. Composição bromatológica e percentual dos alimentos e dieta experimental.....66

TABELA 2. Média, probabilidade (P), e coeficiente de variação (CV) para os consumos de nutrientes de bubalinos alimentados com dieta volumosa e aditivos contendo própolis (LLOS¹) e monensina sódica70

TABELA 3. Média, probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) para os coeficientes de digestibilidade aparente total e parcial em bubalinos alimentados com dieta volumosa e diferentes aditivos contendo monensina e própolis (LLOS³)72

TABELA 4. Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal e da produção de ácidos graxos voláteis para búfalos alimentados com dietas volumosas contendo ou não aditivos LLOS¹ e monensina.....77

TABELA 5. Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de taxa de passagem de líquido (TP, %/hora), tempo de retenção (TeR, horas), taxa de reciclagem (TRec, vezes/dia), taxa de fluxo líquido (TF, litros/hora) e volume ruminal (VR, litros e % do peso corporal) para dieta volumosa contendo ou não produto LLOS à base de própolis e monensina em bubalinos.....79

TABELA 6. Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de teores de MO, nitrogênio total e purinas de microrganismos ruminais, ingestões de matéria orgânica (IMO) e nitrogênio (IN), fluxos omasal de MO, MO microbiana, N microbiano (N-mic), N não microbiano (NN-Mic) no omaso, MO aparentemente degradável no rúmen (MOADR) e MO verdadeiramente degradável no rúmen (MOVDR) e eficiência de síntese microbiana aparente e verdadeira para dietas contendo ou não produto LLOS à base de própolis e monensina em bubalinos.....	82
---	----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Isolamento e caracterização expedita morfológica, bioquímica e cinética de bactérias ruminais tolerantes aos produtos contendo própolis	
FIGURA 1. Morfologias de cepas bacterianas tolerantes ao produto contendo própolis (LLOS).....	31
FIGURA 2. Exemplos de curva de crescimento de cepas bacterianas tolerantes ao produto LLOS, curvas rápidas e demoradas.....	36
FIGURA 3. Representação gráfica da curva de crescimento de algumas cepas tolerantes ao produto à base de própolis LLOS.....	37
Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos	
FIGURA 1. pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) mg/100 mL do líquido ruminal de bovinos em função do tempo após a alimentação com dieta volumosa contendo diferentes aditivos LLOS contendo própolis e monensina pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH ₃) mg/100 mL do líquido ruminal de bovinos em função do tempo após a alimentação com dieta volumosa contendo diferentes aditivos LLOS à base de própolis e monensina.....	52
FIGURA 2. Concentração de ácidos graxos voláteis totais (AGVt); acetato; propionato; butirato em µM/mL do líquido ruminal de bovinos e razão acetato:propionato em função do tempo após a alimentação para dietas volumosas contendo diferentes aditivos LLOS à base de própolis e monensina.....	55

Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bubalinos

FIGURA 1. pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) mg/100 mL do líquido ruminal em função do tempo após a alimentação para búfalos alimentados com dietas volumosas contendo diferentes aditivos $pH = 0,0197H^2 - 0,1874H + 6,8656$ $R^2=0,88$; $NH = 0,3H^3 - 4,1867H^2 + 13,98H + 7,5729$ $R^2 = 0,95$77

FIGURA 2. Concentração de ácidos graxos voláteis totais (AGVt); acetato (Ace); propionato (Prop); butirato (But) em $\mu\text{M/mL}$ do líquido ruminal e razão acetato:propionato (Ace:Prop) em função do tempo após a alimentação para búfalos alimentados com dietas volumosas contendo diferentes aditivos.....78

TABELAS DO APÊNDICE

Página

Tabela 1A- Porcentagem das formas morfológicas de cepas tolerantes a diferentes tipos de LLOS obtidas de animais alimentados com dieta com 100% de silagem de milho e 50% de silagem de milho e 50% de concentrado.....	89
Tabela 2A- Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos pelas cepas bacterianas tolerantes aos produtos LLOSC1 e LLOSB3 (à base de própolis) em dietas com 100% de silagem de milho.....	90
Tabela 3A- Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos pelas cepas tolerantes aos produtos LLOSA2, LLOSC1, LLOSC3 e LLOSD1 (à base de própolis) em dietas com 50% de silagem de milho e 50 % de concentrado.....	91
Tabela 4A- Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos pelas cepas tolerantes ao produto LLOSC1(à base de própolis) em dietas com 50% de silagem de milho e 50 % de concentrado.....	92

RESUMO

Objetivou-se avaliar produtos à base de própolis (LLOS) patenteados (PI nº0605768-3) os quais consistem de extratos de própolis secos variando em extração alcoólica (1, 2 e 3) e concentração de própolis (A, B, C e D): LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSB3, LLOSC3, sobre a caracterização morfológica e bioquímica de cepas bacterianas isoladas tolerantes aos produtos LLOSC1, LLOSB3 em dietas com 100% de volumoso e os produtos LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSC3 em dietas 50% volumoso e 50% de concentrado e a administração dos produtos LLOSB3 e LLOSC1 em comparação com a monensina sódica sobre o consumo e digestibilidade total e parcial da matéria seca e nutrientes, características ruminais e eficiência microbiana em bovinos e bubalinos alimentados com dietas à base de 80% de forragem. Em dietas com 100% de volumoso verificou-se que as cepas tolerantes a LLOSC1 foram superiores em fermentar celobiose (92,4 vs 78,3%) e celulose (57,7 vs 34,8%) em relação às cepas resistentes ao LLOSB3 que se apresentaram mais especialistas. Para a dieta 50:50, volumoso:concentrado, destacou-se o produto LLOSC3 seguido pelo LLOSA2 que selecionaram maior número de cepas generalistas que degradaram os diferentes carboidratos testados: arabinose, celulose, glicose, celobiose, xilose, frutose e lactose. O produto LLOSA2 selecionou cepas que cresceram até 6:30h, os demais selecionaram cepas que possuíam curvas de crescimento que variaram de 6h30 a 37h. Foram utilizados quatro bovinos da raça Holandesa e quatro búfalos da raça Murrah em delineamento experimental quadrado latino 4 x 4 (4 dietas: testemunha, monensina, LLOSC1 e LLOSB3 e 4 períodos para cada espécie). As dietas fornecidas aos bovinos continham 72,5% de volumoso e 27,5% de concentrado, com 14,4% de PB e 67% de NDT e a fornecida aos bubalinos continham 80% de volumoso e 20% de concentrado, com 11,1% de PB e 66% de NDT. Os consumos de MS e demais nutrientes não diferiram entre as dietas experimentais, tanto para bovinos como para bubalinos, exceto para o consumo de NDT em bovinos que foi maior ($P < 0,05$) para a dieta testemunha do que quando adicionado os aditivos. Para bovinos a dieta testemunha foi superior ($P < 0,05$) na digestibilidade total (DT) da MS e nutrientes. Dentre os aditivos testados a monensina influenciou menos negativamente sobre a DT da

MS, MO e PB do que as dietas contendo LLOSC1 e LLOSB3 ($P<0,05$). A digestibilidade ruminal (% do total digerido) da MS, FDN, FDA e CHT foi aumentada ($P<0,05$) pela monensina sódica e LLOSB3 em relação às dietas testemunha e LLOSC1 e o inverso foi observado na digestibilidade intestinal (DI). Houve efeito das dietas sobre o pH ruminal em bovinos e concentrações de AGV totais, acetato e razão acetato:propionato. Maior pH ruminal e menor razão acetato:propionato ($P<0,05$) foi observado para monensina sódica e a dieta LLOSC1 e LLOSB3 apresentaram maiores produções de AGV totais e acetato. Houve aumento do volume ruminal para as dietas LLOSC1 e LLOSB3 (59,5 e 62,2 L, respectivamente) em relação à dieta testemunha (50,5 L). Não houve efeito das dietas sobre a eficiência de síntese microbiana em bovinos. Para os bubalinos a adição de LLOSC1 propiciou maiores ($P<0,05$) coeficientes de digestibilidade total (DT) em relação à testemunha para MS (62,8% vs 59,4%), FDN (58,6% vs 54,3%), CHT (65,1% vs 61,5%) e NDT (65,8 vs 62,3%), e a dieta com monensina foi semelhante à testemunha. A digestibilidade ruminal (% do total digerido) da MS, FDN, FDA e CHT foi superior para dieta testemunha em relação as demais e o menor valor foi para dieta LLOSC1. Menor absorção ruminal de N amoniacal (menor valor de DR da PB) e maiores coeficientes de DI da PB e dos CNE foi observado para dieta LLOSC1 em relação à testemunha. Houve efeito ($P<0,05$) de horário de coleta após a alimentação sobre pH, N-NH₃ e AGV. A dieta LLOSB3 apresentou menor valor de pH ruminal (6,48) e maior produção de butirato (7,94 $\mu\text{M/mL}$) ($P<0,05$) e tendência de maior produção de acetato ($P<0,07$) em relação as demais. A taxa de passagem de líquido não diferiu ($P>0,05$) entre as dietas, porém houve tendência de maior volume ruminal ($P<0,08$) para dietas contendo aditivos em relação a testemunha. O aditivo à base de própolis LLOSC1 apresentou a maior eficiência de síntese microbiana (36,6 g N-Mic/kg MOVDR) em relação à testemunha (25,8 g N-Mic/kg MOVDR). Assim, concluiu-se, que as cepas de bactérias tolerantes aos produtos à base de própolis foram mais generalistas ou especialistas na degradação de diferentes substratos avaliados dependendo do produto LLOS utilizado e tipo de dieta, não se recomenda o uso de monensina sódica e produtos à base de própolis em dietas à base de forragem para bovinos em crescimento, porém recomenda-se o uso do produto LLOSC1 em bubalinos alimentados com dietas volumosas.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, digestibilidade, eficiência microbiana, fermentação ruminal, flavonóides, própolis

ABSTRACT

The objective was to evaluate a propolis based product (LLOS) patented (PI No 0605768-3) which consist of dried extract of propolis ranging in alcohol extraction (1, 2 and 3) and propolis concentration (A, B, C and D): LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSB3, LLOSC3, on the biochemical and morphological characterization of isolated bacteria tolerant to products LLOSC1, LLOSB3 in diets with 100% roughage and products LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSC3 in diets 50% roughage and 50% concentrate and administration of products LLOSB3 and LLOSC1 compared with monensin sodium on intake and total and partial digestibility of dry matter and nutrients, characteristics and rumen microbial efficiency in cattle and buffaloes fed diets based on 80% of roughage. In diets with 100% roughage it was found that the strains tolerant to LLOSC1 were higher in ferment cellobyose (92.4 vs. 78.3%) and cellulose (57.7 vs. 34.8%) compared with strains resistant to LLOSB3 which presented as more specialists. For diet 50:50, roughage:concentrate, it was highlight the product LLOSC3 followed by LLOSA2 that selected a larger number of generalists strains that use the different evaluated carbohydrates: arabinose, cellulose, glucose, celobiose, xylose, fructose, lactose. The product LLOSA2 selected strains that grew until 6:30 h, the others products selected strains that had growth rates ranging from 6:30 to 37:00 h. It was used four Holstein cattle and four Murrah buffaloes in an experimental design Latin square 4 x 4 (4 diets: control, monensin, LLOSC1 and LLOSB3 and 4 periods, for each species). The diets given to cattle roughage containing 72.5% and 27.5% of concentrate, with 14.4% CP and 67% of TDN and buffaloes had given to 80% of roughage and 20% concentrate, with 11.1% of CP and 66% of TDN. The intake of DM and other nutrients did not differ between the experimental diets, as for buffalo and cattle, except for the TDN intake in cattle that was higher ($P<0.05$) for control diet than the others one. The cattle diet control was higher ($P<0.05$) in total digestibility (TD) of DM and nutrients. Among the additives tested the monensin influenced negatively the TD of DM, OM, CP than diets containing LLOSC1 and LLOSB3 ($P<0.05$). The ruminal digestibility (% of total digested) of DM, NDF, ADF and CHT was positively influenced ($P<0.05$) by monensin sodium and LLOSB3 in relation to control diets and

LLOSC1 and the reverse was observed in intestinal digestibility (ID). There was effect of diet on the ruminal pH in cattle and concentrations of total VFA, acetate and relationship acetate:propionate. The highest ruminal pH highest and lowest ratio acetate:propionate ($P<0.05$) was observed for monensin sodium diet and LLOSC1 and LLOSB3 showed higher production of acetate and total VFA. There was an increase in the volume rumen for diets LLOSC1 and LLOSB3 (59.5 and 62.2 L, respectively) compared with the control diet (50.5 L) and there was no effect of diet on the efficiency of microbial synthesis in cattle. For the addition of buffalo LLOSC1 provided higher ($P<0.05$) total digestibility coefficients (TD) in relation to the control for DM (62.8% vs 59.4%), NDF (58.6% vs. 54.3%), CHT (65.1% vs 61.5%) and NDT (65.8 vs. 62.3%), and monensin diet was similar to the control. The ruminal digestibility (% of total digested) of DM, NDF, ADF and CHT were higher control in relation to diet and the other was the lowest values for LLOSC1 diet. Minor rumen absorption of ammonia N (lower value of the CP RD) and higher rates of ID of CP and the NSC was observed for LLOSC1 diet in relation to the control. There was effect ($P<0.05$), time of collection after feeding on pH, $\text{NH}_3\text{-N}$ and VFA. The diet had lower LLOSB3 value of ruminal pH (6.48) and increased production of butyrate (7.94 $\mu\text{M/mL}$) ($P<0.05$) and trend of increased production of acetate ($P<0.07$) compared the other. The passage rate of liquid did not differ ($P>0.05$) between the diets, but there was a tendency for greater volume rumen ($P<0.08$) to diets containing additives regarding control. The propolis based additive LLOSC1 had the highest efficiency of microbial synthesis (36.6 g N-Mic/kg OMDR) in relation to the control (25.8 g N-Mic/kg OMDR). Thus, it was concluded that the bacteria strains tolerant to the propolis based products were more generalists and specialists in the degradation of different evaluated substrates depending on the used LLOS product and type of diet, it is not recommended the use of monensin sodium and propolis based products based on diets based on roughage for cattle in growth, but it is recommended the use of the LLOSC1 product in buffaloes fed with bulky diets.

Keywords: digestibility, flavonoids, microbial efficiency, propolis, rumen fermentation, volatile fatty acids

INTRODUÇÃO

Os ruminantes possuem estrutura estomacal diferenciada, possuindo quatro compartimentos (rúmen, retículo, omaso e abomaso), dos quais destaca-se o rúmen. O rúmen é o maior dos compartimentos, com temperatura (39°C), pH (entre 5,5 - 7,0), anaerobiose, além de suprimento de substrato constante. Essas características fazem do rúmen uma câmara de fermentação. Inúmeros microrganismos povoam o ambiente ruminal, são eles: bactérias, fungos, leveduras e protozoários. A relação entre os microrganismos e o animal é simbiótica, sendo que o animal proporciona o controle do ambiente e os microrganismos proporcionam subprodutos do seu metabolismo que são interessantes ao metabolismo do hospedeiro.

Os microrganismos são responsáveis pela quebra de carboidratos estruturais, como a celulose, o qual o animal degrada pela presença de enzimas do complexo celulase presente nos microrganismos. Os microrganismos ruminais também participam do processo de digestão de outros nutrientes fornecidos ao animal, daí a importância de se conhecer as interações microbiológicas no ambiente ruminal.

A digestão de carboidratos estruturais é efetuada especialmente por bactérias celulolíticas (Gram-positivas) que além de degradarem celulose formando o acetato, também fornecem substrato para outras bactérias, entre elas as metanogênicas (Gram-positivas) que utilizam H₂ e CO₂ para a formação de metano. As bactérias amilolíticas (Gram-negativas) degradam principalmente amido formando o propionato, que é o principal precursor gliconeogênico nos ruminantes. Existem ainda bactérias que degradam lipídeos bem como as proteolíticas (Gram-positivas) que fornecem a principal fonte de nitrogênio para as bactérias celulolíticas, o nitrogênio em forma de amônia (Robson, 1997).

Resumidamente, os microrganismos ruminais degradam carboidratos estruturais e não-estruturais e proteínas até ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato) e amônia, os quais serão utilizados pelos ruminantes em várias rotas metabólicas, ou estes

nutrientes serão fermentados pelos microrganismos com vistas a utilizarem os compostos esqueletos carbônicos dos AGV, mais amônia para a síntese de aminoácidos ou energia para a multiplicação da massa microbiana. Esta será absorvida pelo animal como seu principal suprimento de proteína (Van Soest, 1994; Robson, 1997).

Por isso é necessário saber as interações entre os microrganismos, seus produtos metabólicos (AGV) e o hospedeiro, para que se possa maximizar a produção dos ácidos graxos benéficos (acetato, propionato e butirato) ao animal e minimizar a produção de produtos maléficosem utilidade, como metano e amônia a partir de proteína verdadeira.

A produção de acetato pelas bactérias celulolíticas gera quantidades significativas de H_2 que, juntamente com o CO_2 (que se encontra no meio) é utilizado por bactérias metanogênicas para a formação de metano (CH_4). Devido a isso, procura-se diminuir a razão acetato:propionato no rúmen do animal.

A formação de metano, do ponto de vista nutricional é indesejável nutricionalmente porque diminui a energia metabólica que poderia ser absorvida pelo animal, e também do ponto de vista ambiental, pois o gás metano agrava o efeito estufa.

Atualmente está em vigor o protocolo de Kyoto que foi assinado em 1997, no Japão, que determina cortes nas emissões de dióxido de carbono e de outros gases, como o metano. O metano é vinte e uma vezes mais potente para o efeito estufa do que o dióxido de carbono. Só o rebanho bovino brasileiro emite 10 milhões de toneladas de metano por ano por causa do processo de ruminação, demonstrando a necessidade do país em propor medidas de mitigação desse resultado da atividade pecuária, uma vez que o rebanho brasileiro tem cerca de 159 milhões de cabeças de gado bovino (Anualpec, 2007).

No processo da metanogênese, os bovinos podem produzir até 17 litros de metano/hora, o que pode representar perda de até 12% da energia bruta oriunda do alimento ingerido (Russell, 2002). Em virtude do volume de metano produzido diariamente e da produção do gás carbônico, os ruminantes são considerados como contribuintes importantes na emissão de gases causadores do efeito estufa, juntamente com os campos inundados de arroz e pântanos.

Os animais ruminantes em pastejo são os que mais contribuem para a emissão de metano, visto que há maior produção de acetato pelas bactérias celulolíticas e assim maior substrato para as bactérias metanogênicas.

Para melhorar a nutrição do bovino criado em regime extensivo e diminuir a emissão de metano, alguns autores estudaram o efeito de ionóforos (monensina e lasalocida sódica) em animais em pastejo (Goodrich *et al.*, 1984; Restle *et al.*, 1997,1999).

Todavia, o uso de ionóforos está proibido em alguns países na União Européia desde janeiro de 2006 (Regulamento da Comunidade Européia, 2003). Deste modo, nenhum alimento de origem animal que contenha essas substâncias pode ser produzido ou ter ingresso na União Européia. Conseqüentemente, o uso de ionóforos passa a ser uma barreira não-tarifária para a exportação de carne e leite.

Uso de ionóforos em animais criados em pastejo

Ionóforos são antibióticos usados como aditivos alimentares para melhorar a eficiência de utilização dos alimentos consumidos pelos animais, pois proporcionam aumento da produção de propionato, diminuem a produção de metano, a desaminação de proteína verdadeira e os de níveis de ácido láctico (NRC, 1988). Os ionóforos mais usados na produção animal são a monensina sódica e a lasalocida sódica.

Os ionóforos atuam sobre a população microbiana do rúmen, eventualmente incrementando as bactérias Gram-negativas e provocando diminuição acentuada nas Gram-positivas (produtoras de hidrogênio, precursor do metano) sendo que esta modificação altera as proporções finais de ácidos graxos voláteis, principalmente pelo aumento na proporção de propionato e pela diminuição de acetato e butirato. Essa alteração, em termos de produção animal, é benéfica, pois a produção maior de propionato é energeticamente mais eficiente por reduzir as perdas de metano associadas à produção de acetato e butirato.

A monensina sódica é constituída por moléculas de baixo peso, que ligam íons de minerais e direcionam seus movimentos através das membranas celulares que reduzem o crescimento de bactérias Gram-positivas, afetando a passagem de nutrientes através da membrana dos microrganismos ruminais, o que modifica a fermentação ruminal pela alteração das proporções dos ácidos graxos voláteis (Lana *et al.*, 2002). A lasalocida atua nas trocas de metais mono ou divalentes e prótons pelo sistema antiporte.

Restle *et al.* (1997) suplementaram bovinos mantidos em pastagem com monensina e lasalocida e não verificaram efeito positivo no ganho de peso, entretanto houve melhor eficiência de utilização da pastagem. Também Andrade *et al.* (1996) e Restle *et al.* (1999), forneceram, monensina associada ao suplemento mineral e

lasalocida associada ao suplemento energético e não verificaram influência no ganho de peso para bovinos em condições de pasto.

A bactéria Gram-positiva na presença de monensina tem sua concentração intracelular de potássio diminuída. Ocorre uma entrada de prótons (H^+) resultando na diminuição do pH intracelular. Quando o pH intracelular torna-se ácido, a monensina catalisa um efluxo de prótons na troca do sódio. A inibição do crescimento é atribuída ao ciclo fútil de íons através da membrana intracelular e diminuição do ATP causado pelo ionóforo (Van Nevel, 1991).

A monensina causa decréscimo na produção de metano, pois o aumento na produção de propionato diminui a produção de metabólitos intermediários utilizados na produção de metano, os quais representam ineficiência na utilização de energia (Medel *et al.*, 1991).

As bactérias Gram-positivas são as mais atingidas pelos ionóforos porque elas não possuem uma camada de peptidoglicanos presente na membrana celular de bactérias Gram-negativas. Deste modo, os ionóforos selecionam as bactérias Gram-negativas, produtoras de propionato e inibem as bactérias Gram-positivas, produtoras de acetato, butirato, lactato, H_2 e metano (Chen e Wolin, 1979).

Quando a produção de hidrogênio e metano diminui, os cofatores reduzidos durante a fermentação dos carboidratos são oxidados pela via metabólica de produção de propionato, aumentando a retenção de energia pelo animal (Goodrich *et al.*, 1984).

O ionóforo monensina diminui o crescimento de bactérias proteolíticas (Hino & Russel, 1986) e a degradação de proteína hidrolisada dietética (Russel & Martin, 1984; Barbosa *et al.*, 2001) diminuindo, assim, a degradação da proteína dietética e a produção de proteína microbiana, aumentando a quantidade de proteína alimentar que chega ao duodeno para ser digerida.

Resultados demonstram que a adição do ionóforo melhora a eficiência de utilização do pasto com o aumento da carga animal, sendo este ionóforo mais benéfico no desempenho de bovinos em pastagens (Lana & Russell, 2001).

Potter *et al.* (1976) ao trabalharem com bovinos de corte alimentados com forragens, encontraram aumento de 17% no ganho de peso e de 20% na eficiência alimentar com suplementação de 200 mg de monensina.

Segundo Nagajara (1997) animais em condições de pastejo recebendo monensina aumentaram o ganho de peso diário e a eficiência alimentar. Também, Goodrich *et al.*

(1984) observaram que animais em pastagens e suplementados com monensina ganharam 13,5% mais peso que animais controle.

Lana & Russell (2001) trabalharam com fermentação *in vitro* de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumoso e concentrado, utilizando o ionóforo monensina e observaram que bactérias obtidas de animais recebendo dieta rica em concentrado produziram metade do metano e metade da razão acetato:propionato que as bactérias de animais recebendo forragem. Porém, foi necessária maior quantidade de monensina para reduzir a produção de metano e a razão acetato:propionato que aquele de animais que receberam forragem. As bactérias do rúmen de animais recebendo forragem apresentaram maior sensibilidade à monensina que aquelas de animais recebendo dietas ricas em concentrado. Espera-se, portanto um maior efeito da monensina no desempenho de bovinos com dietas ricas em volumoso. Desta maneira o uso de ionóforos parece promissor em animais em pastejo.

Atividade biológica da própolis

Própolis é o nome genérico para a substância resinosa de composição complexa coletada pelas abelhas a partir dos mais heterogêneos tipos de plantas. A palavra própolis é derivada do grego em que *pro* significa “em defesa de” e *polis* “cidade”, isto é, em defesa da cidade ou da colméia (Marcucci, 1996; Burdock, 1998).

A própolis é coletada por abelhas a partir de diversas partes das plantas como brotos, botões florais, casca e exsudatos resinosos. Durante a coleta as abelhas misturam a cera e a própolis coletada juntamente com a enzima 13 – glicosidase presente em sua saliva, acarretando a hidrólise dos flavonóides glicosilados até suas respectivas agliconas (Park *et al.*, 1997).

A própolis recolhida de uma colméia, também conhecida como própolis bruta, apresenta em sua composição básica cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelhas, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de detritos de madeira e terra (Monti *et al.*, 1983; Cirasino *et al.*, 1987).

A resina contida na própolis é coletada na vegetação das cercanias da colméia. O espectro de vôo de uma abelha *A. mellifera* abrange um raio de cerca de 4 a 5 km em torno da colméia, de onde abelhas campeiras coletam pólen e néctar para alimentação, bem como resina para a própolis. Dessa maneira, a composição da própolis é um reflexo direto da flora vegetal da qual se servem as abelhas (Burdock, 1998; Russo *et al.*, 2002).

Não são conhecidos os fatores que direcionam a preferência das abelhas coletoras de resina por uma determinada fonte vegetal, mas sabe-se que elas são seletivas nesta coleta (Salatino *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2005). Possivelmente, a escolha da planta onde a abelha coleta a própolis esteja relacionada com a atividade antimicrobiana da resina, uma vez que as abelhas utilizam a própolis como um anti-séptico (Sahinler & Kaftanoglu, 2005).

As abelhas usam a própolis para protegê-las contra insetos e microrganismos, empregando-a como anti-séptico em finas camadas nas paredes internas das colméias, para vedar buracos e rachaduras, reparar e fortalecer os favos de mel, proteger a entrada da colméia, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores (Bankova *et al.*, 2000).

A amplitude das atividades farmacológicas da própolis é maior em regiões tropicais do planeta e menor nas regiões temperadas, refletindo a diversidade vegetal destas regiões: nas regiões tropicais a diversidade vegetal é muito superior à diversidade observada nas regiões temperadas (Bankova, 2005).

As propriedades biológicas da própolis obviamente estão diretamente ligadas a sua composição química, e esta possivelmente é o maior problema para sua utilização em fitoterapia, tendo em vista que a sua composição química varia com a flora da região e época da colheita, com a técnica empregada, assim como com a espécie da abelha (grau de "africanização" da *Apis mellifera*); conjunto de fatores que exerce uma enorme importância nas propriedades físicas, químicas e biológicas (Adelmann, 2005).

A complexa composição química da própolis, foi pioneiramente revelada pela técnica de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (CG/EM) o que permitiu a detecção de pelo menos 150 componentes (Greenaway, 1991). É considerada uma das misturas mais heterogêneas encontradas em fontes naturais, sendo que mais de 300 constituintes já foram identificados e/ou caracterizados em diferentes amostras de própolis (Burdock, 1998).

Os principais compostos químicos isolados da própolis até o momento podem ser organizados em alguns grupos principais como: ácidos e ésteres alifáticos, ácidos e ésteres aromáticos, açúcares, álcoois, aldeídos, ácidos graxos, aminoácidos, esteróides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonóides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenóides, proteínas, vitaminas B1, B2, B6, C, E, bem como diversos minerais. De todos esses grupos de compostos, certamente o que mais vem chamando a atenção dos pesquisadores é o dos flavonóides (Havsteen, 2002).

Flavonóides são compostos fenólicos que compreendem um amplo grupo de substâncias naturais não sintetizadas por animais (Beecher, 2003; Manach *et al.*, 2004). Cerca de 4.000 substâncias diferentes já foram listadas como flavonóides, entre elas apigenina, quercetina, hesperetina, rutina, luteolina, genisteina, daidzeina, antocianidina, kampferol etc. A presença e a concentração destes compostos é utilizada como índice de qualificação de amostras de própolis (Lu *et al.*, 2004). A ingestão de flavonóides interfere em diversos processos fisiológicos, auxiliando na absorção e na ação de vitaminas, atuando nos processos de cicatrização como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana e moduladora do sistema imune (Williams *et al.*, 2004). Porém, apesar dos flavonóides serem os componentes da própolis mais extensivamente estudados, eles não são os únicos responsáveis pelas suas propriedades farmacológicas. Diversos outros compostos têm sido relacionados com as propriedades medicinais da própolis (Awale *et al.*, 2005).

Nos últimos anos a literatura científica vem relatando as propriedades farmacológicas da própolis de interesse médico – farmacêutico tais como atividades bacteriostática e bactericida, fungistática e fungicida, virustática e virucida, antioxidante, anti-tumoral, cicatrizante, reparadora tissular, anestésica, contra parasitas intestinais e sanguíneos, antimutagênica e contra doenças cardiovasculares e respiratórias (Fontana *et al.*, 2004). A caracterização de todas estas atividades biológicas associadas à tendência de utilização de produtos naturais tem resultado num aumento da demanda de própolis e produtos contendo própolis, como extratos, comprimidos, cápsulas, nebulizações ou pós (Menezes *et al.*, 1997).

Durante os últimos anos tem sido relatada *in vitro* a atividade antimicrobiana da própolis que se deve aos flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres presentes na resina natural. A galangina, pinocembrina e pinostrombina são tidos como os flavonóides mais efetivos contra bactérias. Os ácidos ferúlicos e cafeíco também contribuem para a ação bactericida da própolis.

O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e provavelmente baseado na inibição da RNA-polimerase bacteriana (Bosio *et al.*, 2000), podendo decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxíácidos e sesquiterpenos (Marcucci, 1995).

Todas as pesquisas realizadas com substâncias isoladas de própolis demonstraram que nenhum componente isolado tem uma atividade maior do que o extrato total inicial (Marcucci, 1996; Kujumgiev *et al.*, 1999).

Diversos pesquisadores têm demonstrado a atividade antibacteriana em culturas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritides* etc, entre eles Bankova *et al.* (1995).

Ensaio de antibiose com a própolis, frente a 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas, constataram que a atividade antibacteriana da própolis é mais efetiva sobre as Gram-positivas (Antunes *et al.*, 1996).

A maioria dos estudos não detecta a inibição no crescimento de *Candida albicans* em cultura, embora poucos estudos como o de Sosa *et al.* (1997) e Hegazi *et al.* (2000) tenham constatado a inibição desta levedura pela própolis.

A inibição de crescimento de *Helicobacter pylori* foi observada por Ohsugi *et al.* (1997) e Boyanova *et al.* (2005). Desta forma, a inibição de úlceras gástricas através da ingestão de própolis, possivelmente, está relacionada à atividade anti-helicobacter, já que esta bactéria é reconhecidamente associada às úlceras.

Ensaio *in vitro* avaliaram o efeito da própolis sobre a proliferação de vírus da gripe de aves (Kujumgiev *et al.*, 1999) que resultaram na inibição destes vírus.

Todavia, ainda não existem relatos do estudo da ação antibacteriana da própolis sobre as diferentes bactérias anaeróbicas ruminais, nem quais seriam tolerantes a sua administração, mas existem indícios que há efeito o qual é medido pelos produtos de fermentação dessas bactérias. Assim, são necessários estudos para conhecer como a própolis atua no ambiente ruminal.

Uso da própolis em experimentação animal

Nos últimos anos a própolis tem sido objeto de várias pesquisas na área zootécnica. O primeiro experimento foi realizado em coelhos por Scapinello *et al.* (1998) que utilizaram solução hidroalcoólica de própolis no desempenho de coelhos Nova Zelândia Branco, de 40 a 90 dias de idade e compararam com animais recebendo coccidiostático robenidina. Os autores observaram que a inclusão da solução hidroalcoólica de própolis prejudicou o desempenho dos coelhos no período experimental; porém, o uso da solução hidroalcoólica de própolis não influenciou as características de carcaça e o peso de vísceras comestíveis.

Ainda em coelhos Nova Zelândia Branco, Pontara *et al.* (1998) avaliaram o uso de solução hidroalcoólica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocistos por grama de fezes (OOPG) de *Eimeria ssp.* A utilização de robenidina como coccidiostático nas rações dos coelhos mostrou-se mais efetiva que a solução hidroalcoólica de própolis

adicionada a água de beber. No entanto, a adição da solução hidroalcoólica de própolis reduziu linearmente o número de oocistos por grama de fezes (OOPG) de *Eimeria spp.*

Em coelhos em crescimento, Coloni *et al.* (2007) trabalharam com extrato etanólico de própolis (40% de própolis em álcool 70) sobre o ganho de peso, parâmetros de carcaça e pH cecal e observaram que os coelhos que receberam extrato etanólico de própolis (duas doses de: 0,8 mL e 1,5 mL por dia) foram semelhantes em todos os parâmetros aos que receberam as dietas com o álcool etílico e sem nenhum aditivo, com exceção do peso das patas.

Garcia *et al.* (2004) estudaram o efeito do extrato alcoólico de própolis (30% de própolis em álcool 90 (p/p), com dosagens de 1000, 2000 e 3000 ppm de extrato alcoólico de própolis, os quais foram adicionados as rações antes do processo de peletização), sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. Observou-se que os níveis de glicose, transaminases e desidrogenase láctica apresentaram diferenças entre tratamentos, sendo as maiores alterações nos animais do tratamento com 3000 ppm de extrato de própolis. Os coelhos que consumiram rações com 1000 ppm de extrato de própolis apresentaram melhor desempenho, enquanto os que receberam 3000 ppm de própolis na ração demonstraram os piores resultados, provavelmente por alterações no metabolismo.

Moraes *et al.* (2007) avaliaram diferentes níveis de própolis em pó sobre as características de sêmen de coelho e observaram que adição da própolis na ração elevou a porcentagem de espermatozoides normais e reduziu os anormais. A motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática, pH e a cor não foram afetados pelos diferentes níveis de própolis, dentro dos valores considerados normais para coelhos.

Também destacam-se trabalhos que avaliaram a resposta da própolis em peixes, Pontara *et al.*, (2006) avaliaram o desempenho da tilápia do Nilo alimentadas com diferentes níveis de núcleo para ração SL491* à base de própolis, utilizando cinco níveis de inclusão de SL491* nas rações e uma testemunha (sem adição do produto), observou-se que a adição de SL491* promoveu um efeito significativo no peso médio final dos peixes, no ganho de peso médio, e na espessura do couro. A conversão alimentar, comprimento padrão e o fator de condição, não foram influenciadas pela adição de SL491*.

Kuradomi *et al.* (2006) mensuraram o desempenho de tilápia do Nilo na fase de reversão sexual alimentadas com rações contendo SL491* à base de própolis, onde foi

utilizada uma inclusão crescente de SL491* (0%, 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0% e 2,5%). O ganho de peso, o peso final, a altura, o comprimento padrão e o comprimento total, aumentaram linearmente com o aumento dos níveis de SL491*, concluindo-se que a inclusão de própolis às rações melhorou o desempenho das tilápias.

Aly & Elewa (2007) estudando o efeito da própolis egípcia sobre o crescimento de *Aspergillus versicolor* no queijo “Ras”(queijo típico do Egito) observaram que a concentração de própolis de 1000 ppm pode prevenir o crescimento de fungos e toxinas no queijo “Ras”.

Todavia, em animais ruminantes concentra-se o maior número de trabalhos recentes, devido aos possíveis benefícios que o extrato de própolis pode proporcionar ao ambiente ruminal. Para conhecer os efeitos do extrato de própolis sobre a microbiota ruminal Broudiscou *et al.* (2000) testaram o efeito de treze extratos secos de plantas com alto teor de flavonóides e própolis sobre a fermentação e metanogênese em cultura contínua de microrganismos ruminais e observaram que a própolis aumentou a produção de propionato (fonte de energia) em 10,3% e diminuiu a população de protozoários.

Stradiotti Jr *et al.* (2004a) estudaram a ação da própolis (30% de própolis em álcool 70% ou álcool 99,6%) sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal, e observaram que a própolis foi eficiente em inibir a atividade de desaminação de aminoácidos pelos microrganismos ruminais tanto *in vitro* quanto *in vivo*, embora não tenha alterado a proporcionalidade entre os ácidos graxos voláteis (AGV). A própolis aumentou a concentração total dos mesmos, o que, em linhas gerais, confere aos ruminantes maiores possibilidades de se manterem e produzirem a partir de uma mesma dieta.

Em continuação a linha de pesquisa, Stradiotti Jr *et al.* (2004b) observaram que o extrato de própolis inibiu a produção de gases provenientes da fermentação de diferentes alimentos, e ainda observaram que a maior dosagem de extrato de própolis (66,7%) mostrou-se eficiente na produção final total de gases tanto para carboidratos fibrosos quanto para não-fibrosos. Observaram que o extrato não afetou o consumo de matéria seca, o pH e a amônia no rúmen e a concentração de proteína microbiana no líquido ruminal de bovinos alimentados com volumoso. Todavia, a própolis inibiu a desaminação pelos microrganismos ruminais, indicando que pode reduzir o nível ruminal de amônia, em situações de dietas contendo altas taxas de proteína degradável/

carboidrato fermentável. Além do possível efeito benéfico na redução da razão acetato:propionato e produção de metano.

Com a finalidade de testar extrato de própolis sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio, Oliveira *et al.* (2004) observaram que a própolis foi eficiente em reduzir a produção de amônia das diferentes fontes de nitrogênio, assim como foi mais eficiente que a monensina em reduzir a atividade de desaminação.

Em experimento seqüencial foi analisado o efeito da monensina e da própolis (30% de própolis em álcool 70% (p/V), diluição 1:1) sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais e Oliveira *et al.* (2006) observaram que 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. A produção de amônia normalizou-se assim que o ionóforo monensina foi removido do meio de cultura, provavelmente em razão do restabelecimento da população de bactérias produtoras de amônia, comprovando que esse antibiótico apenas inibe estes microrganismos. No tratamento com própolis, a produção de amônia manteve-se em níveis baixos mesmo após sua remoção do meio de cultura, sugerindo que a população proteolítica haveria sido eliminada pela própolis.

Com o objetivo de avaliar se o óleo pode agir como aditivo alimentar em conjunto ou não com o extrato de própolis Lana *et al.* (2005) testaram óleo de soja (4% de óleo de soja na MS) juntamente com a própolis (30% de própolis em álcool 70% – 10 ml por dia) na alimentação de cabras leiteiras e registraram que o óleo de soja reduz os consumos de matéria seca e de fibra em detergente neutro na presença de extrato etanólico de própolis e aumenta os teores de gordura, proteína e sólidos totais no leite de cabra, aumenta o pH e reduz a razão acetato:propionato no líquido ruminal. O extrato de própolis interfere pouco no consumo, na digestibilidade, produção e composição do leite e nos parâmetros de fermentação ruminal de cabras em lactação.

Dando continuidade a análise de possíveis aditivos naturais para a nutrição de ruminantes Lana *et al.* (2007) avaliaram óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras quanto ao consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. A própolis foi testada tanto em extrato (0,0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 mL/animal/dia, 50% p/V de própolis moída em solução alcoólica a 70% em água); quanto em própolis bruta moída (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 g/animal/dia); os níveis de óleo de soja testados foram 0,0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; e 7,5% da MS. Observou-se que não

houve efeito de níveis de óleo de soja, extrato etanólico de própolis e própolis bruta moída sobre o consumo de MS e de nutrientes e sobre os parâmetros ruminais estudados.

Com a intenção de avaliar a influência do extrato de própolis sobre o desempenho de vacas leiteiras Stelzer *et al.* (2006) avaliaram efeito de níveis de concentrado e própolis (30% de própolis em álcool 70% (p/V) em dose de 34 mL por dia) em rações com 20% e 40% de concentrado e observaram que a própolis líquida testada não interferiu sobre o desempenho. Também Freitas *et al.* (2007) trabalharam com extrato etanólico de própolis (extrato de própolis misturado a ração concentrada e seco em estufa de ventilação forçada a 55°C) na alimentação de vacas leiteiras e observaram que a adição de própolis apresentou efeito somente sobre a produção de leite e teores de proteína do leite, não apresentando efeito sobre a produção de leite corrigido para 4% de gordura nem sobre o número de células somáticas e porcentagem de gordura do leite.

Testando adições de diferentes extratos de própolis LLOS secos em três teores alcoólicos (1, 2 e 3) e quatro concentrações de própolis (LLOSA, LLOSB, LLOSC e LLOSD) já patenteados como patrimônio intelectual (PI nº0605768-3), monensina sódica e testemunha (sem aditivos) em dietas com relação volumoso:concentrado 50:50%, Prado *et al.* (2006) observaram que o maior valor de digestibilidade foi para a dieta com adição do LLOSC1, de 57,4%, e os menores valores foram para a dieta com monensina (54,0%) seguido da dieta testemunha (53,0%). Na mesma linha de pesquisa, Pontara *et al.* (2006) observaram em dietas exclusivamente de volumoso (feno de Tifton) com adição dos mesmos aditivos, anteriormente relacionados, que os maiores valores de DIVMS foi para a adição de LLOSB3 (49,1%), LLOSC1 (45,6%) e menor valor para dietas testemunha e adição de monensina (39,3%).

Em teste com os produtos LLOS Pontara *et al.* (2007) avaliaram a utilização dos produtos LLOSA2 e LLOSC1 à base de própolis (PI nº0605768-3) e do ionóforo lasalocida sódica no desempenho de bezerras lactentes e observaram que não houve efeito da substituição do ionóforo pelos diferentes produtos à base de própolis sobre o desempenho, conversão alimentar e digestibilidade das rações, sugerindo que os produtos à base de própolis podem substituir o uso do ionóforo lasalocida sódica em bezerras.

Alguns pesquisadores testaram outras possíveis atividades da própolis envolvendo o bem estar animal, como Loureiro *et al.* (2007a) que avaliaram a eficácia do extrato de própolis no controle de helmintoses de cordeiros naturalmente infectados e observaram

que a adição de 30 mg de extrato de própolis foi mais efetiva em reduzir o número de ovos tipo *Strongyloida* por grama de fezes (3,06) do que 15 mg de própolis (3,09) e o tratamento controle (3,53) nos cordeiros estudados, portanto demonstrando possível efeito da própolis em reduzir a ovoposição dos endoparasitos. Ainda Loureiro *et al.* (2007b) estudaram as concentrações sanguíneas de uréia, creatinina, proteínas totais, albumina e glicose de cordeiros alimentados com extrato de própolis na ração e concluíram que a adição de extrato de própolis as rações dos cordeiros não provocou alterações importantes nos parâmetros bioquímicos, que pudessem indicar reações adversas a sua administração.

Com o objetivo de testar a eficácia do extrato de própolis em vacas com quadro de mastite Pinto *et al.* (2001) estudaram o efeito de extratos de própolis verde. Os resultados mostraram que o extrato etanólico de própolis comercial, e o metanólico inibiram o crescimento das amostras de bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos e *Streptococcus agalactiae*.

Vale ressaltar que nos trabalhos realizados com própolis em ruminantes, não há uma padronização de extratos (grau alcoólico, percentagem de própolis) nem de forma física (pó e líquido) nem de incorporação na ração.

Deste modo se confirmado a eficácia de um produto à base de própolis em pó, com extrato conhecido, dose conhecida, de fácil incorporação na ração e com controle de qualidade, teoricamente será possível afirmar aos consumidores, que os animais receberiam um aditivo alimentar natural bacteriostático que auxilia na preservação do meio ambiente (diminuição da emissão de metano) a saúde humana (produto natural, sem a criação de resistência bacteriana) e respeitando as exigências alfandegárias de países mais exigentes como aos pertencentes a União Européia.

Tendo em vista os resultados preliminares e a possível ação antibacteriana da própolis e do produto à base de própolis (LLOS) testado anteriormente em estudos de digestibilidade *in vitro* da matéria seca, no presente trabalho objetivou-se avaliar os produtos LLOS já patenteados (PI 0605768-3) e sua dosagem *in vivo* mediante o experimento de avaliação do efeito da inclusão da monensina ou produto LLOS (LLOSB3 e LLOSC1) a base de própolis em rações com 80% de volumoso e 20% de concentrado sobre a digestibilidade total e parcial da matéria seca e de nutrientes e parâmetros ruminais (NH₃, AGV e pH) e eficiência microbiana em bovinos e bubalinos e testar os produtos LLOS (LLOSB3, LLOSC1, LLOSA2, LLOSC3, LLOSD1) à base de própolis sobre o isolamento e identificação morfológica e bioquímica dos

microrganismos ruminais tolerantes ao produto LLOS, à base de própolis. Em todos os experimentos foram utilizadas as dosagens do produto LLOS extrapoladas de experimentos anteriores *in vitro*.

Literatura citada

- ALY, S. A.; ELEWA, N. A.; The effect of Egyptian honeybee propolis on the growth of *Aspergillus versicolor* and sterigmatocystin biosynthesis in ras cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 74, p. 74-78, 2007.
- ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná, 2005, 186p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 2005.
- ANDRADE, V. J.; CORDEIRO, J. S.; FERREIRA, M.B.D. *et al.* Monensina na terminação de novilhos mestiços zebu x angus, a pasto. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 33, 1996, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza: SBZ, p. 23-27. 1996.
- ANTUNES, R. M. P.; CATAO, R. M. R.; CEVALLOS, B.S.O. Antimicrobial activity of propolis. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p.15-18, 1996.
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - **ANUALPEC 2007**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2007. 340 p.
- AWALE, S.; SHRESTHA, S. P.; TEZUKA, Y. *et al.*, Neoflavonoids and related constituents from nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of Natural Products**, v.68, n.6, p.858-864, 2005.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1/2, p.114-117, 2005.
- BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L. D.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; KUJUMGIEV, A. *et al.* Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.50c, p.167-172, 1995.
- BARBOSA, N. G. S. LANA, R. P.; MÂNCIO, A.B. *et al.* Fermentação da proteína de seis alimentos por microrganismos ruminais, incubados puros ou com monensina ou rumensin®. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1316-1324, 2001.
- BEECHER, G.R. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. **Journal of Nutrition**, v.133, n.10, p.3248S-3254S, 2003.
- BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A. *et al.* In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.
- BOYANOVA, L.; GERGOVA, G.; NIKOLOV, R.; *et al.* Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, n.5, p.481-483, 2005.

- BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, n.3-4, p.263-277, 2000.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v. 36, p. 347-363, 1998.
- CHEN, M.; WOLIN, M.J. Effect of monensin and lasalocid-sodium on the growth of methanogenic and rumen saccharolytic bacteria. **Application Environment Microbiology**, v.38, n.1, p.72-77, 1979.
- CIRASINO, L.; PISATI, A.; FASANI, F. Contact dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**, v.16, n.2, p.110-111, 1987.
- COLONI, R. D.; LUI, J. F.; SANTOS, E. *et al.* Extrato etanólico de própolis sobre o ganho de peso, parâmetros de carcaça e pH cecal de coelhos em crescimento. **Biotemas**, v.20, n.2, p.59-64, 2007.
- FONTANA, J. D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; *et al.* **Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity**. In: New Jersey: Humana press, p. 203-218. 2004.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p. 48-51, 1999.
- FREITAS, J. A.; ANTONANGELO, R. P.; RIBEIRO, J. L. *et al.*, Extrato etanólico de própolis na alimentação de vacas leiteiras: produção de leite, teores de gordura e proteína do leite e contagem de células somáticas. In: **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – Unesp, Jaboticabal – SP, 2007.
- GARCIA, R. C.; SÁ, M. E. P.; LANGONI, H. *et al.* Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, Maringá, v. 26, n. 1, p. 57-67, 2004.
- GREENAWAY, W.; MAY, J.; SCAYSBROOK, T. *et al.* Identification by Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of 150 compounds in propolis. **Zeitschrift Fur Naturforschung**, v. 46 c, p. 111-121, 1991.
- 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, n.6, p.1484-1498, 1984.
- GOUET, F. E.; JOUANY, S. P. *et al.* L'écosystème microbien du réticulo-rumen. In: **Nutrition des ruminants**. INRA editions, p. 299-348. 1995.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v.96, n.2/3, p.67-202, 2002.
- HEGAZI, A. G.; ABD, E. I.; HADY, F. K.; ALLAH, F. A. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.55c, p.70-75, 2000.
- 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.
- HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. ed. Academic Press, New York, p. 533, 1966.

- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. *et al.* Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, p. 235-240, 1999.
- KURADOMI, R. Y.; RIBEIRO, R. P.; PONTARA, L. P. M.; *et al.*, Desempenho de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual alimentados com rações contendo SL491* à base de própolis. In: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – João Pessoa/PB, 2006.
- LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Efeito da monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de bovinos sob dietas ricas em volumosos ou concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 1, p. 254-260, 2001.
- LANA, R. P.; OLIVEIRA, J. S.; BORGES, A. C. *et al.* Efeito da monensina e lasolocida sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 724-730, 2002.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; QUEIROZ, A. C. *et al.* Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.650-658, 2005.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; RODRIGUES, M. T. *et al.* Óleo se soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras: consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n. 1, p. 191-197, 2007.
- LOUREIRO, C. M. B.; SOBRINHO, A. G. S.; SANTANA, A. E. *et al.*, Eficácia do extrato de própolis no controle de helmintoses de cordeiros naturalmente infectados. In: **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – Unesp, Jaboticabal – SP, 2007a.
- LOUREIRO, C. M. B.; SOBRINHO, A. G. S.; SANTANA, A. E. *et al.* Concentrações sanguíneas de uréia, creatinina, proteínas totais, albumina e glicose de cordeiros alimentados com extrato de própolis na ração. In: **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – Unesp, Jaboticabal – SP, 2007b.
- LU, Y.; WU, C.; YUAN, Z. Determination of hesperetin, cinnamic acid and nicotinic acid in propolis with micellar electrokinetic capillary chromatography. **Fitoterapia**, v.75, n.3/4, p.267-276, 2004.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C. *et al.* Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, n.5, p.727-747, 2004.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.
- MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, n. 5, p. 529-535, 1996.
- MEDEL, M.; MERINO, P.; THOMAS, R. *et al.* Modo de acción del monensin en metabolismo ruminal y comportamiento animal. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 18, n. 3, p. 153-173, 1991.
- MENEZES, H.; JR, M. B.; OLIVEIRA, S. D. *et al.* Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. **Apidologie**, v. 28, n. 2, p. 71-76, 1997.

- MONTI, M.; BERTI, E.; CARMINATI, G. et al. Occupational and cosmetic dermatitis from propolis. **Contact Dermatitis**. v.9, n.2, p.163, 1983.
- MORAES, G. V.; MATAVELI, M.; BERTAGLIA, F. A. et al., Níveis de própolis sobre as características do sêmen de coelhos. In: **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – Unesp, Jaboticabal – SP, 2007.
- NAGAJARA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. Manipulation of ruminal fermentation In:HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (eds). **The Rumen Microbial Ecosystem**. Blackie academic e professional. London, p.523-632, 1997.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. Washington, D.C.: National Academy Press, 1988. 158p.
- OHSUGI M.; BASNET P.; KADOTA S. Antibacterial activity of traditional medicines and an active constituent lupulone from *Humulus lupulus* against *Helicobacter pylori*. **Journal of Traditional Medicines**, v.14, p.186-191, 1997.
- 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.
- OLIVEIRA, S. J.; QUEIROZ, S. A.; LANA, P. R. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p. 275-281, 2006.
- 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, p. 97-106, 1997.
- PINTO, M. S.; FARIA, J. E.; MESSAGE, D. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 6, p. 278-283, 2001.
- PONTARA, L. P. M.; SCAPINELLO, C.; MARTINS, E.N. et al. Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e robenidina sobre a contagem de oocistos por grama de fezes em coelhos Nova Zelândia Branco. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n.2, p.325-330, 1998.
- PONTARA, L. P. M.; SOUZA, M. L.; KIOSHIMA, R. S. et al. Desempenho de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes níveis de SL491* à base de própolis nas rações. In: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – João Pessoa/PB, 2006.
- PONTARA, L. P. M.; ZEOULA, L. M.; PRADO, O. P. P. et al. Digestibilidade in vitro da matéria seca de rações com 100% de volumoso e adição de produtos LLOS à base de própolis ou ionóforo. In: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – João Pessoa/PB, 2006.
- PONTARA, P. P. M.; CASIMIRO, T. R.; ZEOULA, L. M. et al. Utilização do produto LLOS à base de própolis no desempenho de bezerras lactentes. In: **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – Unesp, Jaboticabal – SP, 2007.
- POTTER, E. L.; COOLEY, C.O.; RICHARDSON, L.F. et al. Effect of monensin on performance of cattle fed forage. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 665-669, 1976.

- PRADO, O. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. *et al.* Digestibilidade in vitro da matéria seca de rações com 50% de volumoso e 50% de concentrado e adição de produtos LLOS à base de própolis ou ionóforo. In: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – João Pessoa/PB, 2006.
- REGULAMENTO (CE) Nº1831/2003 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 22 de setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal **Jornal Oficial da União Européia L 268/29**, 18.10.2003.
- RESTLE, J.; ROSO, C.; SOARES, A.B. Lasalocida sódica suplementada via sal para fêmeas de corte mantidas em pastagem. In: **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 1997, Juiz de Fora. *Anais...* Viçosa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.179-181. 1997.
- RESTLE, J.; SOARES, A.B.; FERREIRA, M.V.B. *et al.* Suplementação associada com lasalocida para novilhos em terminação em pastagem cultivada de inverno. **Ciência Rural**. v. 29, n.3, p. 555-559, 1999.
- ROBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. ed. 2, p.523 – 632, 1997.
- ROSO, C.; RESTLE, J. Lasalocida sódica suplementada via sal para fêmeas de corte mantidas em pastagem cultivada de estação fria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.3, p.830-834, 2001.
- 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. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, New York, p. 119, 2002.
- RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v. 73, p. S21-S29, 2002.
- SAHINLER, N.; KAFTANOGLU, O. Natural product propolis: chemical composition. **Natural Product Research**, v.19, n.2, p.183-188, 2005.
- SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G. *et al.* Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. **Evidence based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.
- SCAPINELLO, C.; MOURA, L. P. P.; MARTINS, E. N. *et al.* Efeito da solução hidroalcoólica de própolis e robenidina no desempenho de coelhos em crescimento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.1, n.1, p.150-156, 1998.
- SOSA, S.; BARICEVIC, D.; INCO, M. *et al.* Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v.7, p.168- 171, 1997.
- STELZER, F. S.; LANA, R. P.; CAMPOS, J. M. S. *et al.* Efeito de níveis de concentrado e própolis sobre o desempenho de vacas leiteiras. In: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – João Pessoa/PB, 2006.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R.P. *et al.* Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004a.

- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R. P. *et al.* Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1093-1099, 2004b.
- TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G.; MEIRA, R.M. *et al.* Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.85- 92, 2005.
- VAN NEVEL, C. J. Modification of rumen fermentation by use of additives, IN: JOUANY, J.P. **Rumen Microbial metabolism and ruminant digestion**. INRA editions, Paris, p.374, 1991.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, p. 476, 1994.
- WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais no presente trabalho foram de avaliar produtos contendo própolis (LLOS) patenteados (PI nº0605768-3) os quais consistem de extratos de própolis secos variando em extração alcoólica (1, 2 e 3) e concentração de própolis (A, B, C e D): LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSB3, LLOSC3, sobre:

a) Técnicas de isolamento de cepas bacterianas tolerantes aos produtos LLOSC1, LLOSB3 em dietas com 100% de volumoso e os produtos LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSC3 em dietas com relação volumoso:concentrado 50:50, quanto a sua caracterização morfológica e bioquímica,

b) A administração dos produtos LLOSB3 e LLOSC1 em comparação com a monensina sódica e dieta testemunha sobre o consumo e digestibilidade total e parcial da matéria seca e nutrientes, pH, concentrações de amônia e ácidos graxos voláteis, taxa de diluição ruminal e eficiência microbiana em bovinos e bubalinos alimentados com dietas com 80% de forragem.

Isolamento e caracterização expedita morfológica, bioquímica e cinética de bactérias ruminais tolerantes aos produtos contendo própolis

Resumo: Objetivou-se avaliar por meio de técnicas de isolamento e caracterizações morfológica e bioquímica cepas bacterianas tolerantes aos produtos à base de própolis (LLOS) provenientes de líquido ruminal de vacas fistuladas no rúmen e alimentadas com dietas com relação volumoso:concentrado 100:0 e 50:50. Para as dietas com 100% de volumoso foram avaliados os produtos LLOSC1 e LLOSB3, e para as dietas com 50:50% os produtos LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2 e LLOSC3, que diferiram no teor alcoólico e na concentração de própolis. Tubos com capacidade para 100 mL, contendo 75 mL de meio de cultura anaeróbico mais os produtos LLOS teste e líquido ruminal foram incubados a 39°C durante 6 dias. Após os procedimentos de isolamento de bactérias ruminais as cepas foram submetidas a coloração de Gram e o crescimento bacteriano foi monitorado com auxílio de espectrofotômetro no comprimento de 600 nm. Procedeu-se teste de habilidades de fermentação de arabinose, celulose, glicose, celobiose, xilose, frutose e lactose. Em dietas com 100% de volumoso verificou-se que as cepas tolerantes a LLOSC1 foram superiores em fermentar celobiose (92,4 vs 78,3%) e celulose (57,7 vs 34,8%) do que cepas resistentes ao LLOSB3 que se apresentaram mais especialistas. Para a dieta com igual proporção de volumoso e concentrado (50:50) destacaram-se os produtos LLOSC3, seguido pelo LLOSA2, que selecionaram maior número de cepas generalistas e degradaram todos os diferentes carboidratos testados. Para o LLOSC1, registraram-se maior capacidade de fermentação da celulose (57,7 vs 31,8%), celobiose (92,4 vs 77,3%), arabinose (61,6 vs 45,4) e lactose (100 vs 77,3%) por cepas tolerantes obtidas da dieta contendo 100% de silagem, em relação àquelas obtidas de dieta com 50:50%. Em geral, o estudo indicou que o produto LLOS criou condições para uma maior porcentagem de Gram-positivas que foi diferente do esperado e, com curvas de crescimento que variaram de 6h até 37h e foram mais generalistas ou especialistas na degradação de diferentes substratos dependendo do produto LLOS utilizado e tipo de dieta.

Palavras-chaves: aditivo, carboidratos, cepas bacterianas, fermentação

**Isolation and morphological, biochemical and kinetic expeditiously
characterization of rumen tolerant bacteria to propolis**

Abstract: The objective was to evaluate through isolation and morphological characterizations and biochemical techniques's of bacterial strains tolerant to propolis based products (LLOS) from ruminal liquid of cannulated cows and fed diets with 100% roughage and 50:50% roughage:concentrate. For the diets with 100% roughage were evaluated the products: LLOSC1 and LLOSB3, and for diets with 50:50% products: LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2 and LLOSC3, which differ in alcohol content and the concentration of propolis. Tubes with a capacity of 100 mL, containing 75 mL of anaerobic growth medium plus products LLOS test and ruminal liquid were incubated at 39°C for 6 days. After the procedures for isolation of the rumen bacteria, the strains were submitted to the Gram collour and bacterial growth was monitored with the help of spectrometer length of 600 nm. There was done test of skills of fermentation from arabynose, cellulose, glucose, cellobiose, xylose, fructose, lactose. In diets with 100% roughage it was found that the strains tolerant to LLOSC1 were better in ferment cellobiose (92.4 vs 78.3%) and cellulose (57.7 vs 34.8%) than strains resistant to LLOSB3 that appear more specialists. For the diet with equal proportion of roughage and concentrate (50:50) it was highlight the products LLOSC3 followed by LLOSA2 which selected higher number of generalists strains and degraded all the different evaluated carbohydrates. For LLOSC1 tested in different situations of food, it was observed a higher capacity of cellulose fermentation (57.7 vs 31.8%) cellobiose, (92.4 vs 77.3%) arabynose (61.6 vs 45.4%) and lactose (100 vs 77.3%) by tolerant strains obtained of diet containing 100% of silage, in relation to those obtained from diet with 50:50%. In general, the strains of bacteria tolerant to the product LLOS had greater percentage of Gram positive, with growth rates ranging from 6:30 to 37:00 h and were more generalists or specialists in the degradation of different substrates used depending on the product LLOS and type of diet.

Key-words: aditives, bacterial strains, carbohydrates, rumen fermentation

Introdução

As bactérias presentes no rúmen são responsáveis pelos processos fermentativos que fornecem ao animal hospedeiro ácidos graxos voláteis (AGV) e proteína microbiana principalmente. Dentre elas destacam-se, por serem as majoritárias, as celulolíticas (ex. *Fibrobacter succinogenes*); as hemicelulolíticas e pectinolíticas (ex. *Butyrivibrio fibrosolvans*) e as fermentadoras de açúcares solúveis (*Succinivibrio dextrinosolvans*) (Russell, 2002). Em geral, as bactérias celulolíticas, produtoras de acetato e as metanogênicas são Gram-positivas, e as bactérias produtoras de propionato são Gram-negativas. Ainda existem bactérias que são Gram-variáveis, mudando sua estrutura de membrana conforme o meio em que está inserida (Robson, 1997).

As características de membrana das bactérias do rúmen podem ser responsáveis pela sensibilidade e conseqüente morte da bactéria quando certos aditivos são adicionados às dietas. Entre eles destacam-se os ionóforos que ultrapassam facilmente a membrana celular de bactérias Gram-positivas, fazendo que fiquem túrgidas e ocorra a lise celular. A monensina, por exemplo, liga-se ao íon sódio e o transporta através da membrana plasmática de células Gram-positivas. Com o influxo de cátions para dentro da célula ocorre aumento da pressão osmótica, esta torna-se túrgida e tende a lisar-se (Lana *et al.*, 2002).

O uso da própolis como aditivo para dietas de ruminantes tem sido objeto de estudos, e suas propriedades antibacterianas registradas na literatura. Antunes *et al.* (1996) em ensaios de antibiose com adição de própolis, frente a 10 bactérias Gram-positivas e 20 Gram-negativas (bactérias aeróbicas) constataram que a atividade antibacteriana da própolis foi mais efetiva sobre as Gram-positivas. O mecanismo de atividade antimicrobiana é complexo e segundo Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) é provável que esteja envolvido na inibição da RNA-polimerase bacteriana.

Broudiscou *et al.* (2000) testaram o efeito de treze extratos secos de plantas com alto teor de flavonóides e própolis sobre a fermentação e metanogênese em cultura contínua de microrganismos ruminais e observaram que a própolis aumentou a produção de propionato em 10,3% e diminuiu a população de protozoários.

Stradiotti Jr *et al.* (2004) observaram que o extrato de própolis incubado em 100 mg de feno de braquiária, 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.

Foram testados produtos à base de própolis (LLOS) em pó, sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Resultados positivos sobre essa variável foi observado. Em dietas exclusivamente volumosas (feno de Tifton) os maiores valores de DIVMS foram de 49,1%, para a adição de LLOSB3 e de 45,6% para LLOSC1 e menores valores foram para dietas testemunha e monensina que não diferiram entre si, com média de 39,3% (Prado, 2005). Segundo o mesmo autor, em dietas com razão volumoso:concentrado 50:50% o maior valor de DIVMS foi para o tratamento LLOSC1 (57,4%) e os menores valores foram para a dieta com monensina (54,0%) seguido da dieta testemunha (53,0%).

Desta forma, no presente trabalho objetivou-se fazer um estudo exploratório das cepas bacterianas tolerantes aos produtos à base de própolis LLOS (em diferentes extrações alcoólicas: 1, 2 e 3 e concentrações de própolis: A, B, C e D), por meio de técnicas de isolamento de cepas bacterianas e caracterização morfológica e bioquímica. Os produtos LLOS testados foram LLOSC1, LLOSB3 para dietas com 100% de volumoso e os produtos LLOSC1, LLOSD1, LLOSA2, LLOSC3 para dietas com 50:50% de volumoso:concentrado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Rúmen localizado na sede Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG, bem como, no Campo Experimental de Coronel Pacheco, MG (CECP) e ainda no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, PR).

Os produtos-teste à base de própolis (LLOS) em pó, foram: LLOSC1 e LLOSB3 para dietas com 100% de volumoso e LLOSC1, LLOSD1, LLOSC3 e LLOSA2 para dietas com 50% volumoso e 50% de concentrado. Esses produtos contendo extratos de própolis secos tem patente com patrimônio intelectual (PI nº0605768-3) e se diferenciaram em três extrações alcoólicas denominadas 1, 2 e 3 e por 4 concentrações de própolis diferenciadas pelas letras A, B, C e D. Os produtos LLOS foram selecionados a partir do ensaio de digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) realizado por Prado (2005).

Os produtos contendo própolis LLOS foram preparados de acordo com metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999). Entretanto, para o presente experimento foi necessária uma re-extração dos produtos LLOS, pois os mesmos

apresentavam-se em forma sólida o que impossibilitava a sua inclusão em meio de cultura denominado GSM, (Growth Study Medium) um meio líquido estéril e anaeróbico. Para isso foram pesadas 5 g do produto em um recipiente estéril e adicionado aproximadamente 75 mL de álcool (50:50 V/V). A solução foi levada ao banho de ultrassom por 15 minutos. Após a extração essa solução foi previamente filtrada em filtro sinterizado e o resíduo sólido lavado duas vezes, resultando assim numa solução de 100 mL do produto. O procedimento de filtração esterilizante foi realizado em capela de fluxo laminar previamente desinfetada, utilizando-se membrana Millipore 0,22 µm de diâmetro, na presença de fluxo constante de CO₂.

Os meios de cultura anaeróbios para os procedimentos de isolamento de bactérias ruminais teve preparo prévio aos procedimentos. O meio de cultivo para crescimento de bactérias foi denominado GSM, Growth Study Medium (Odenyo et al. 1998) o qual continha os seguintes ingredientes por 100 mL: 0,3 g de glicose; 0,2 g de triptona; 0,1 g de extrato de carne; 5 mL de solução mineral 1; 5 mL de solução mineral 2; 1 mL de ácidos graxos voláteis; 0,1 mL resazurina; 0,4 g de Na₂CO₃; e 81,9 mL de água destilada.

A solução de diluição anaeróbica (ADS) utilizada foi composta de: 3,75 mL de solução mineral 1; 3,75 mL de solução mineral 2 e quantidade suficiente de água destilada para 100 mL. E o meio utilizado para a separação de colônias denominados roll-tube (Hungate, 1969) continham os seguintes ingredientes por 100 mL de meio: 2,0 mL de ágar; 0,1 g de glicose; 0,4 g de celobiose; 0,1 g de extrato de carne; 0,2 g de triptona; 0,05 g de amido solúvel; 5 mL de solução mineral 1; 5 mL de solução mineral 2; 0,1 mL de resazurina; 1,0 mL de ácidos graxos voláteis; 30,0 mL de líquido ruminal clarificado; 0,2 mL de hemim; 0,4 g de Na₂CO₃ e 52,9 mL de água destilada.

As soluções minerais 1 e 2 foram utilizadas como ingredientes no meio de cultura GSM, roll-tube e no ADS; e a composição da solução mineral 1 foi de 0,6 g de K₂HPO₄ em 100 mL de água destilada em meio anaeróbico e a solução mineral 2 de 0,6 g de KH₂PO₄; 1,2 g de NH₄SO₄; 1,2 g de NaCl; 0,25 g de MgCl 7H₂O e 0,16 g de CaCl₂ 2H₂O em 100 mL de água destilada em meio anaeróbico (Bryant & Burkey, 1953).

Para obtenção de bactérias ruminais foram utilizadas quatro vacas secas Holandês X Zebu canuladas no rúmen e alimentadas com dietas contendo 50:50 e 100:0 de volumoso:concentrado.

As vacas foram mantidas estabuladas em instalação coberta, com acesso a água limpa e cochos equipados com sistema de portão eletrônico do tipo Calan Gate que

permitia a cada vaca acesso apenas a uma determinada dieta. O consumo individual foi anotado diariamente. Inicialmente duas vacas receberam a dieta 50:50% volumoso:concentrado e duas vacas receberam 100% de volumoso. Na seqüência, as dietas foram alternadas, isto é, os animais que foram alimentados com a dieta 100% de volumoso recebiam a dieta 50:50% volumoso:concentrado e vice-versa. Este procedimento visou diminuir a interferência de microbiota específica entre animais.

O volumoso utilizado foi a silagem de milho e o concentrado composto percentualmente de 76% de fubá de milho; 20% de farelo de soja; 1% de uréia; 2% de calcário calcítico e 1% de sal mineralizado (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição química das dietas experimentais

Dieta	MS (%)	PB ¹ %	EE ¹ %	MO ¹ %	FDN ¹ %	FDA ¹ %	MM ¹ %
100% silagem de milho	26,00	7,10	3,12	93,71	58,41	35,37	6,29
50% silagem de milho e 50% concentrado	56,48	13,80	2,9	94,14	35,19	20,5	5,86

¹Percentagem dos nutrientes na MS

O período de adaptação às dietas experimentais foi de 15 dias. Após esse período foi realizada a coleta manual do conteúdo ruminal no período da manhã, antes da alimentação matinal.

A amostragem do conteúdo ruminal em torno de 1 litro realizada antes da alimentação teve como objetivo obter uma população microbiana relativamente uniforme, com mínimo de partículas alimentares, sem a necessidade de procedimentos de filtração demorados, que, pela exposição do conteúdo ruminal ao oxigênio presente no ar poderia alterar a microbiota ruminal. O conteúdo ruminal era filtrado apenas uma vez numa peneira e imediatamente acondicionado em garrafa térmica (pré-aquecida) para manutenção da temperatura em torno de 39°C. O material amostrado era levado ao laboratório de microbiologia do rúmen.

Do líquido ruminal amostrado foi retirada uma alíquota de 5 mL, que foi injetada através de seringa e agulhas estéreis em tubo com capacidade para 100 mL, contendo 75 mL de meio de cultura anaeróbico GSM (Odenyo et al. 1998) além da inclusão de 2,0 mL de cisteína HCl (1,25%), 1,0 mL de complexo de vitamina B e 3,0mL do produto LLOS a ser testado.

Os tubos inoculados com as amostras foram incubados a 39°C durante 6 dias. Após esse período, 1 mL do meio de cultura incubado foi transferido para tubos de

ensaio tipo Hungate contendo: 8 mL do meio GSM, 0,1 mL de complexo de vitamina B, 0,2 mL de cisteína HCl e mais 0,3 mL do produto LLOS teste.

Após dois dias de crescimento 1 mL do meio de cultura contido no tubo de Hungate foi retirado e diluído em solução anaeróbica (ADS) armazenados em tubos de penicilina de 10 mL, até as diluições 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-7} . Depois de realizadas as diluições, 0,3 mL foram transferidos anaerobiamente para os roll-tubes (tubos contendo GSM mais ágar manipulados conforme Hungate, 1969) para o isolamento de cepas.

Dois dias após a inoculação nos roll-tubes, as colônias bacterianas isoladas crescidas foram repicadas com o auxílio de uma alça de platina, sob anaerobiose, em novos tubos contendo: 8 mL do meio GSM; 0,1 mL de complexo de vitamina B; 0,2 mL de cisteína HCl;

Para a confirmação de pureza das cepas foi feita observação morfológica em microscópio ótico em objetiva de 100X com imersão em óleo, tanto na cultura a fresco como após a coloração de Gram.

As cepas puras isoladas que demonstraram capacidade de tolerarem os produtos LLOS testados foram classificadas através de características fenotípicas (morfologia, coloração de Gram), bioquímicas e cinéticas (curva de crescimento). Para a característica bioquímica de fermentação de arabinose, celulose, glicose, celobiose, xilose, frutose e lactose; foi utilizado o meio GSM substituindo na mesma proporção o uso de glicose pelos carboidratos que foram testados.

Curvas de crescimento foram estabelecidas por meio do cultivo de cepas isoladas em meio líquido contendo glicose como fonte de carboidrato. Foi utilizada a técnica de turbidimetria para o monitoramento do crescimento bacteriano. Para medição da absorbância, foi utilizado o comprimento de 600 nm em espectrofotômetro adaptado para leitura em tubo de ensaio e confirmado por observação microscópica. Foram retiradas amostras das cepas na fase de crescimento exponencial para coloração de Gram, as quais foram fotografadas.

Os dados observados são de caráter qualitativo e foram analisados por agrupamento de frequência em porcentagem.

Resultados e Discussão

Foram obtidas 66 cepas bacterianas tolerantes ao produto LLOS em inóculo proveniente de vacas alimentadas com 50% de silagem de milho de 50% de concentrado, dividindo-se em: 22 cepas tolerantes a LLOSC1, 19 cepas tolerantes a LLOSD1, oito cepas tolerantes a LLOSA2 e 17 cepas bacterianas tolerantes a LLOSC3

(Tabela 2). Em inóculo de vacas recebendo dietas com 100% de silagem de milho, obteve-se 49 cepas bacterianas, sendo 26 cepas bacterianas tolerantes a LLOSC1 e 23 cepas bacterianas tolerantes a LLOSB3. Desta forma, totalizou-se o isolamento de 115 cepas bacterianas e 31,6% de cepas de bactérias tolerantes ao produto LLOS em relação a 364 tentativas de isolamento de cepas de colônias (Tabela 2). Todavia, não é possível afirmar a diversidade genética das cepas isoladas, pois para a identificação das cepas obtidas em nível de gênero ou espécie é necessário maior número de parâmetros fenotípicos, fisiológicos e o emprego de técnicas de biologia molecular que não foram usadas neste experimento.

Tabela 2 - Percentagem de cepas puras de bactérias tolerantes ao produto à base de própolis LLOS¹ em relação as tentativas de repicagem de colônias isoladas obtidas de conteúdo ruminal de vacas alimentadas com dietas experimentais

Produto LLOS	Flavonóides totais (mg /g de LLOS) ²	Tentativas de repicagem de colônias isoladas	Cepas (nº absolutos)	% de cepas em relação às tentativas
100% silagem de milho				
LLOSC1	0,018	72	26	36,1
LLOSB3	0,011	84	23	27,4
50% de silagem de milho e 50% de concentrado				
LLOSD1	0,031	36	19	52,8
LLOSC3	0,030	34	17	50,0
LLOSC1	0,018	75	22	29,3
LLOSA2	0,001	63	8	12,7
Total geral		364	115	31,6

¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1, 2 e 3) e diferentes concentrações de própolis (A, B, C e D), LLOSC1, LLOSB3, LLOSD1, LLOSC3 e LLOSA2. ² Concentrações de flavonóides totais medido em concentrações de crisina por meio de análise química cromatográfica (Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE) para os produtos LLOS (Prado, 2005).

Observou-se que quanto maior o teor de flavonóides (medido em concentrações de crisina) dos produtos LLOS (Prado, 2005), maior foi a percentagem de cepas isoladas de bactérias tolerantes a um produto LLOS específico. Desta forma, quanto maior o teor de substâncias ativas do produto LLOS, melhor a capacidade de obtenção de cepas, isto é, observou-se menor número de cepas de organismos tolerantes aos produtos LLOS. É considerada cepa, para fins deste estudo, a colônia que apresenta somente uma morfologia (bastonete ou cocos, por exemplo) e somente uma coloração Gram (Gram-positiva ou Gram-negativa).

Assim, observou-se que quando o inóculo foi obtido de vacas recebendo dietas volumoso:concentrado 50:50 e o mesmo foi submetido aos produtos LLOSD1 e LLOSC3, de maior concentração de flavonóides (cerca de 0,030 mg de flavonóides/g de

LLOS), esses propiciaram as maiores porcentagem de cepas em relação às tentativas de repicagem de colônias isoladas, isto é, 52,8% de cepas de bactérias tolerantes a LLOSD1 e 50,0% tolerantes a LLOSC3.

Para o produto LLOSC1 com concentração de 0,018 mg de flavonóides/g de LLOS (Prado, 2005) utilizado nas duas situações de alimentação, observou-se 36,1% de cepas do inóculo obtido de vacas alimentadas com 100% de silagem de milho em relação aos 29,3% de cepas obtidas em vacas alimentadas com 50% de silagem de milho e 50% de concentrado. A diferença na porcentagem pode ter ocorrido pela diferença relativa das populações de microrganismos nessas situações, devido ao efeito seletivo causado pelas dietas. Porém, o conteúdo ruminal retirado de vacas consumindo 100% de volumoso provavelmente apresenta uma microbiota com maior número de bactérias celulolíticas, que, segundo Russell (2002) são mais susceptíveis a ação de antibióticos e ionóforos.

Assim, sugere-se que o produto LLOSC1 administrado em animais consumindo 100% de silagem de milho, causou provavelmente maior população de bactérias amilolíticas, o que resultou num melhor índice de repicagem quando comparado com o mesmo produto incubado em amostra proveniente de vacas recebendo 50:50% de volumoso e concentrado. Nessa última condição de alimentação, a microbiota possivelmente mais diversificada é constituída por uma população de bactérias celulolíticas, e também de outras populações, entre elas, bactérias degradadoras de amido, de proteínas e de açúcares solúveis. Estes grupos tróficos distintos, segundo Russel (2002) possuem permeabilidades de membrana diferentes; portanto, seriam menos susceptíveis ao produto LLOSC1. É provável que ao fornecer dietas com razão 50:50 de volumoso e concentrado, propiciem maior número de cepas tolerantes ao LLOSC1, ocasionando maior tolerância entre cepas no produto LLOSC1 e menor percentual de cepas isoladas (29,3%), uma vez que, tais cepas teriam as mesmas características de membrana, estando sujeitas, portanto, aos mesmos efeitos em presença do LLOS o que dificultou o processo de isolamento.

O menor percentual de cepas isoladas significa que LLOSC1 em dietas com 50:50% de volumoso:concentrado provavelmente apresentou mais cepas resistentes em mesma diluição, mantendo a diversidade da população microbiana.

Os produtos LLOSB3 e LLOSA2 que continham menores teores de flavonóides, de 0,011 e 0,001 mg de flavonóides/g de LLOS, respectivamente, adicionados as dietas

com 100% de volumoso e 50:50% de volumoso:concentrado, apresentaram menor percentual de cepas isoladas de 27,4% para LLOSB3 e de 12,7% para LLOSA2.

Observou-se que a porcentagem de cepas de bactérias tolerantes aos produtos LLOS que apresentam coloração Gram-positiva foi em média de 80,9% e coloração Gram-negativa foi de 19,1% para as diferentes proporções de volumoso:concentrado (Tabela 3).

Tabela 3 - Percentagem de cepas puras de bactérias que apresentaram coloração Gram-positiva e Gram-negativa tolerantes aos diferentes produtos LLOS¹, à base de própolis, incubadas nas diferentes proporções de volumoso:concentrado.

Produto LLOS	Volumoso: Concentrado	Gram (+)	Gram (-)	Total
LLOSC1	100:00	76,9	23,1	100,0
LLOSB3	100:00	87,0	13,0	100,0
LLOSD1	50:50	84,2	15,8	100,0
LLOSC3	50:50	76,5	23,5	100,0
LLOSC1	50:50	86,3	13,6	100,0
LLOSA2	50:50	62,5	37,5	100,0
Todos os produtos LLOS	100:0 e 50:50	80,9	19,1	100,0

¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1, 2 e 3) e diferentes concentrações de própolis (A, B, C e D), LLOSC1, LLOSB3, LLOSD1, LLOSC3 e LLOSA2

Segundo Russell (2002) as bactérias que apresentam coloração Gram-positiva na sua maioria são mais susceptíveis a ação de antibióticos e ionóforos que as bactérias que apresentam coloração Gram-negativa. Deste modo às bactérias Gram-negativas seriam mais tolerantes a ação dessas substâncias. Entretanto, neste estudo para as dietas avaliadas na presença dos produtos LLOS as bactérias Gram-positivas foram encontradas em maior proporção.

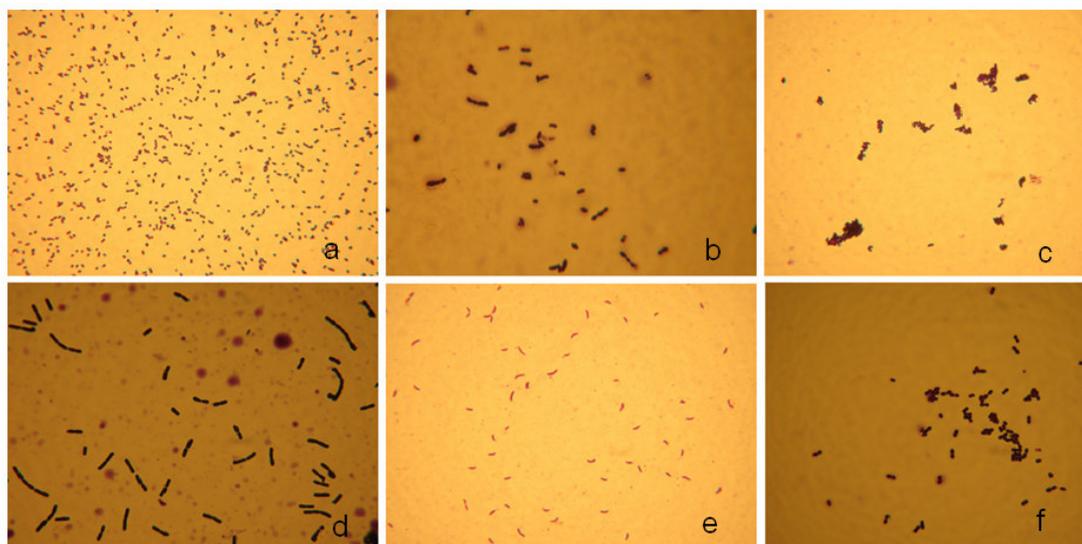
Todavia, a estrutura do experimento para obtenção das colônias puras não permitiu afirmar se realmente foi maior o número de cepas Gram-positivas tolerantes à própolis, devido também a pressão seletiva de 6 dias no processo de isolamento. Vale ressaltar que como as bactérias ruminais são anaeróbicas existem algumas dificuldades quanto ao procedimento de fixação das mesmas na lâmina, sendo que algumas podem apresentar alta sensibilidade ao oxigênio atmosférico e se romperem durante esse processo, havendo a possibilidade da proporção entre Gram-positivas e Gram-negativas ser influenciada (Johnson *et al.*, 1995). Também, deve ser considerado o fato de muitas bactérias serem Gram-variáveis, adaptando-se ao meio em que são cultivadas e mudando a conformação de sua membrana plasmática (Hungate, 1966; Russel, 2002). Conseqüentemente, o estudo foi exploratório sugere-se que haja continuidade nesta

linha de pesquisa, com o uso de métodos moleculares quantitativos, como, por exemplo PCR tempo real associados a métodos filogenéticos.

O grande número de cepas bacterianas que apresentam coloração Gram-positiva pode indicar ainda que o mecanismo de atuação da própolis pode ser diferente do modo de atuação dos ionóforos. Esse fato já foi observado por Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) que relataram um mecanismo de atividade antimicrobiana complexo para o extrato de própolis que é baseado na inibição do RNA-polimerase bacteriano, que pode decorrer de um efeito sinérgico entre flavonóides, hidroxiácidos e sesquiterpenos.

Ainda, pela pressão de seleção apresentado nos primeiros seis dias de incubação com o produto LLOS pode ter favorecido a sobrevivência de bactérias Gram-positivas.

Todavia, analisando os produtos LLOS individualmente verifica-se que o produto LLOSA2 na dieta com 50:50% (volumoso:concentrado) apesar de possuir menor porcentagem de cepas de bactérias (12,7%) apresentou maior porcentagem de cepas com coloração Gram-negativa (37,5%) em relação aos demais extratos.



a) diplococcus; b) streptococcus; c) staphilococcus; d) bastonete; e) bastonete curvo; f) cocobacillus

Figura 1 – Morfologias de cepas bacterianas tolerantes ao produto contendo própolis (LLOS)

As cepas bacterianas tolerantes ao produto LLOS apresentaram as principais morfologias: bastonete, bastonete curvo, cocobacillus, diplococcus, streptococcus, staphilococcus (Figura 1); entre as quais destacou maior porcentagem de bastonete com 24,5% para a dieta 100% volumoso e 47% para a dieta 50:50 volumoso:concentrado;

bastonete curvo com 24,5% para 100% volumoso e 13,6% para 50:50 volumoso:concentrado e cocobacilus com 32,7% para 100% volumoso e 17,6% para 50:50 volumoso:concentrado.

Tabela 4 - Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos, expressa em percentagem de cepas de bactérias tolerantes aos diferentes produtos à base de própolis LLOS¹, obtidas de animais alimentados com diferentes dietas (100% de silagem de milho e 50% silagem de milho:50% concentrado)

Capacidade de Fermentação	Celulolíticos		Hemicelulolíticos + Pectinolíticos		Fermentadores de açúcares solúveis		
	Celulose	Celobiose	Arabinose	Xilose	Frutose	Glicose	Lactose
100% de Silagem de milho							
LLOSC1							
Efetiva (+)	57,7	92,4	61,6	65,4	88,4	100	100
Nenhuma (-)	42,6	7,6	38,4	34,6	11,5	0	0
Total	100	100	100	100	100	0	100
LLOSB3							
Efetiva (+)	34,8	78,3	47,8	47,8	73,9	100,0	82,6
Nenhuma (-)	65,2	21,7	52,2	52,2	26,1	0,0	17,4
Total	100	100	100	100	100	100	100
50% Silagem de milho e 50% Concentrado							
LLOSD1							
Efetiva (+)	52,7	52,6	63,2	57,9	57,9	100	94,8
Nenhuma (-)	47,3	47,4	36,8	42,1	42,1	0	5,2
Total	100	100	100	100	100	100	100
LLOSC3							
Efetiva (+)	64,8	94,1	76,5	70,6	94,1	100	100
Nenhuma (-)	35,2	5,9	23,5	29,4	5,9	0	0
Total	100	100	100	100	100	100	100
LLOSC1							
Efetiva (+)	31,8	77,3	45,4	63,6	86,4	100	77,3
Nenhuma (-)	68,2	22,7	54,6	36,4	13,6	0	22,7
Total	100	100	100	100	100	100	100
LLOSA2							
Efetiva (+)	75	87,5	75,0	62,5	100,0	100	87,5
Nenhuma (-)	25	12,5	37,5	37,5	0	0	12,5
Total	100	100	100	100	100	100	100

(+): Crescimento visual (meio turvo) em 48hs; (-): Não houve crescimento até 48h de incubação;
¹LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1, 2 e 3) e diferentes concentrações de própolis (A, B, C e D), LLOSC1, LLOSB3, LLOSD1, LLOSC3 e LLOSA2

Analisando-se os diferentes produtos LLOS testados em cepas provenientes de animais alimentados com dietas com 100% de silagem de milho, observa-se que as cepas tolerantes a LLOSC1 foram mais capazes de fermentar celobiose (92,4% vs 78,3%) e celulose (57,7% vs 34,8%) do que cepas resistentes ao LLOSB3 (Tabela 4). A maior quantidade de cepas celulolíticas para LLOSC1 mostrou que teve menor ação sobre as bactérias que degradam celulose.

Comportamento semelhante foi observado em relação aos outros carboidratos testados, ou seja, a capacidade de fermentação das cepas tolerantes ao produto LLOSC1 é maior do que as cepas tolerantes ao produto LLOSB3 em todos os açúcares restantes (arabinose, xilose, frutose e lactose) exceto a capacidade de fermentação da glicose que é a mesma nos dois produtos. Este fato é um comportamento comum, pois cada bactéria ruminal possui a sua especificidade por substratos, pois em sua maioria utilizam monômeros ou oligômeros os quais são liberados do tecido vegetal pela hidrólise dos polímeros, incluindo amido, pectina, celulose, hemicelulose e lipídeos.

Entre as bactérias que fermentam os produtos da hidrólise de polímeros, inclui-se “especialistas” como o *Ruminobacter amylophilus*, o qual utiliza somente amido ou seus produtos de degradação e *Fibrobacter succinogenes*, o qual utiliza principalmente celulose ou seus produtos. Em contraste, cepas de *Butyrivibrio fibrisolvens* são “generalistas” os quais podem hidrolisar uma gama de substratos, incluindo amido, celulose, xilano e pectina e os seus conseqüentes produtos de hidrólise. Outra bactéria, como a *Selenomonas ruminantium*, apresenta pequena habilidade para hidrolisar muitos polímeros, mas pode utilizar uma grande faixa de produtos de hidrólise que são provavelmente gerados *in vivo* pelas atividades de espécies hidrolíticas (Stewart *et al.*, 1997).

Desta forma, observou-se que o produto LLOSC1 foi tolerado por maior número de cepas, que degradaram todos os diferentes carboidratos testados. As cepas tolerantes a LLOSB3 foram mais específicas; das 23 cepas isoladas somente seis cepas foram capazes de degradar todos os carboidratos testados, todas as outras cepas têm uma incapacidade de degradar pelo menos um açúcar, além da celulose. Esses dados podem indicar que LLOSB3 possa ter ação mais efetiva sobre grupos específicos de bactérias ruminais, mostrando diferenças de atuação do produto LLOSC1 e LLOSB3 provenientes de animais alimentados com dietas contendo 100% de silagem de milho. Maior concentração de flavonóides totais em crisina foi observado no produto LLOSC1 de 0,018 mg/g de LLOS em relação ao produto LLOSB3 de 0,011 mg/g de LLOS, segundo Prado (2005). Porém outros compostos podem estar atuando.

Entre os quatro produtos LLOS testados (LLOSC3, LLOSD1, LLOSC1 e LLOSA2) em inóculo proveniente de animais alimentados com dietas contendo 50% de silagem de milho e 50% de concentrado (Tabela 4) a maior capacidade de fermentação de celobiose foi apresentada pelas cepas tolerantes ao produto LLOSC3 (94,1%), seguida pelas cepas tolerantes ao produto LLOSA2 (87,5 %), LLOSC1 (77,3 %) e a

menor pelas cepas tolerantes ao produto LLOSD1 (52,6 %). A maior capacidade de fermentação da celulose foi apresentada pelas cepas tolerantes a LLOSA2 (75%), seguido por LLOSC3 (64,8%), e a menor capacidade de fermentação da celulose foi apresentada pelas cepas tolerantes ao LLOSC1 (31,8 %).

Assim, contrário a cepas tolerantes aos LLOSA2 e LLOSC3 que se destacaram por apresentarem maior capacidade de fermentaram celulose e celobiose, vale ressaltar que as cepas tolerantes ao LLOSC1 apresentaram uma baixa capacidade de fermentação de celulose em relação a celobiose. Essa característica fermentativa é observada em várias espécies ruminais entre elas: *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Prevotella ruminicola*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis*, as quais não possuem a capacidade de degradar a celulose; porém são capazes de degradar a celobiose (Goet *et al.* 1995).

Quanto a capacidade celulolítica da microbiota ruminal resistente ao produto LLOS registrou-se que cepas tolerantes ao LLOSD1 apresentaram capacidade semelhante de fermentar celulose e celobiose.

A capacidade hemicelulolítica e pectinolítica foi medida através da capacidade de fermentação de dois carboidratos: arabinose e xilose. A arabinose e xilose foram fermentadas pela maioria das cepas tolerantes ao LLOSC3, seguida pelo LLOSA2. Os mesmos açúcares foram fermentados em proporções menores por cepas tolerantes aos demais produtos LLOS.

A maior capacidade de fermentação da arabinose (76,5%) e da xilose (70,6%) foi observada para as cepas tolerantes ao LLOSC3 e a menor fermentação desses carboidratos, respectivamente, foi para cepas tolerantes LLOSC1 (45,4%) e LLOSD1 (57,9%).

A fermentação de glicose pelas cepas tolerantes ao produto LLOS foi de 100%. Percentagem semelhante foi obtida para a frutose pelas cepas tolerantes a LLOSA2 e apenas de 57,9% para as cepas tolerantes a LLOSD1. A lactose foi fermentada por todas as cepas tolerantes a LLOSC3 (100%) e por 77,3% das cepas tolerantes a LLOSC1.

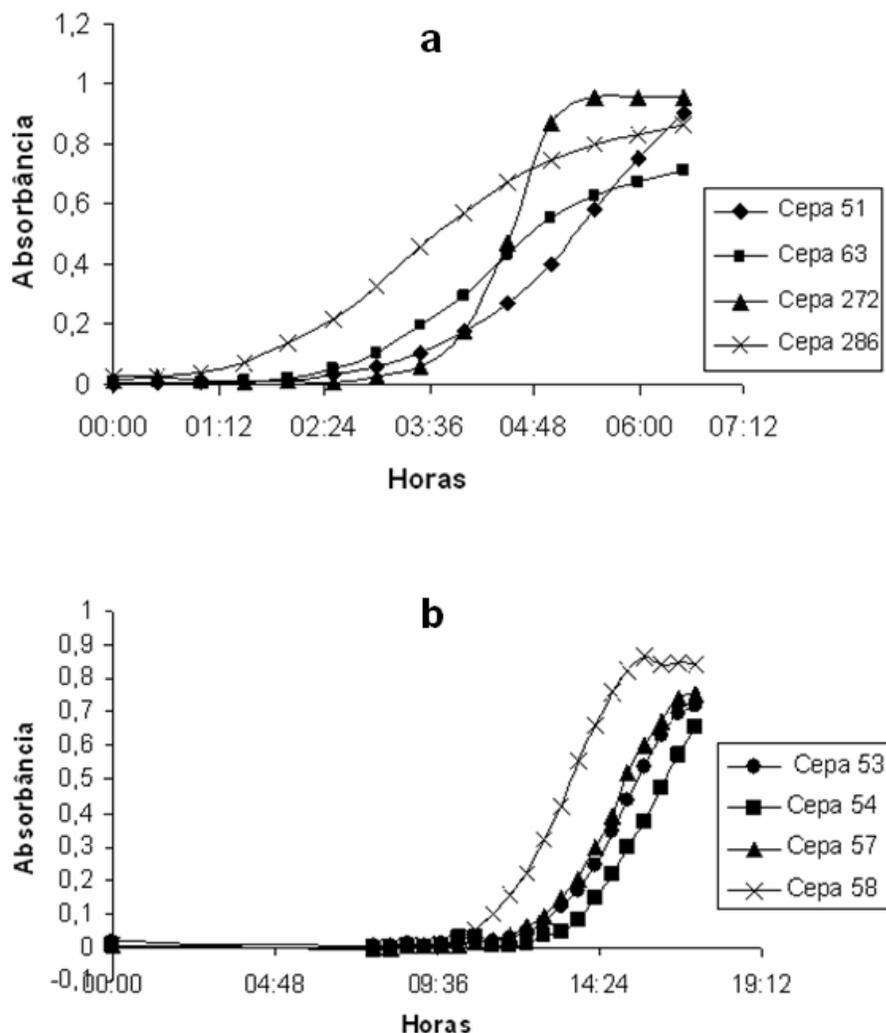
Observando o padrão de fermentação de cada cepa tolerante aos diferentes produtos LLOS de inóculo proveniente de animais alimentados com dietas com 50% de silagem e 50% de concentrado, verificou-se que os produtos LLOSA2 (0,001 mg de flavonóides totais em crisina/g de LLOS) e LLOSC3 (0,030 mg de flavonóides totais em crisina/g de LLOS) selecionaram na sua maioria cepas capazes de fermentar todos os carboidratos testados e observou-se também que a diferença em termos de concentração de flavonóides totais em crisina não afetou a capacidade de fermentação dos

carboidratos. Esses resultados sugerem que a substância marcadora mensurada (crisina) pode não corresponder ao grupo de flavonóide que esteja atuando nas bactérias ruminais e que substância ou grupo de substâncias atuantes na fermentação talvez sejam relativamente mais polares e precisariam ser melhor quantificadas utilizando outra substância marcadora, como a quercetina que é substância padrão mais polar que a crisina (Prado, 2005). Assim, o trabalho demonstrou que existem princípios ativos distintos e ainda não quantificados em cada tipo de LLOS e que estes devem atuar em populações diferentes de bactérias ruminais e além de provavelmente, em protozoários.

Desta forma, em situações de animais que estão consumindo uma dieta com igual proporção de volumoso e concentrado (50:50) é interessantes selecionar bactérias que possuam a capacidade de degradar o amido e açúcares solúveis e bactérias que tenham a capacidade de degradar a celulose de forma equilibrada. Assim, pode-se afirmar que o produto LLOSC3 seguido pelo LLOSA2 apresentaram essas características desejadas. O produto LLOSC1 foi tolerado por cepas com capacidade de fermentação mais diversa; incluindo capacidade celulolítica diminuída.

Para LLOSC1 testado nas diferentes situações de alimentação, registrou-se maior capacidade de fermentação da celulose, celobiose, arabinose e lactose por cepas obtidas da dieta contendo 100% de silagem, em relação àquelas obtidas de dieta com 50:50%. Todavia, a capacidade de fermentação da xilose, glicose e frutose foram semelhantes para as cepas tolerantes a LLOSC1 obtidas em ambas dietas (Tabela 4). A diferença de capacidade de fermentação das cepas tolerantes a LLOSC1 nas diferentes dietas, possivelmente, deve-se ao fato de que a população microbiana ruminal muda de acordo com a dieta fornecida ao animal. Em dietas contendo maior proporção de volumoso, provavelmente, ocorrerá uma população significativa de bactérias que degradam carboidratos estruturais em comparação com dietas contendo concentrados.

As cepas foram categorizadas em crescimento rápido e crescimento lento em glicose provenientes das duas dietas testadas e agrupadas independentemente do tipo de produto usado para a seleção (Figura 2).



a) gráfico de cepas com crescimento rápido em até 6 h de incubação b) gráfico de cepas com crescimento lento após 6 h de incubação

Figura 2 – Exemplos de curva de crescimento de cepas bacterianas tolerantes ao produto LLOS, curvas rápidas e demoradas.

As cepas resistentes aos produtos LLOS dividiram-se em dois padrões distintos de crescimento; um grupo de cepas cresceu em até 6:30 h de incubação (o horário limite de medição foi definido aleatoriamente) e o outro grupo cresceu das 8:00 h até às 37:00 h de incubação, com exceção das cepas tolerantes LLOSA2 que cresceram todas em até 6:30 h.

Como esperado, as cepas tolerantes aos produtos LLOS que cresceram em até 6:30 h de incubação têm mais afinidade de fermentar outros açúcares solúveis, além da glicose. Entre as cepas que cresceram até esse tempo destaca-se a cepa 230, tolerante a LLOSC1, que em 4:00 h já havia atingido a fase estacionária e as cepas 99 e 350, tolerantes a LLOSB3, que atingiram a fase estacionária em 4:30 h (Figura 3), todas

provenientes de animais recebendo 100% de silagem de milho, provavelmente *S. bovis* ou similar. A cepa 165, tolerante a LLOSA2 provenientes de animais recebendo 50% silagem de milho e 50% de concentrado destacou-se, pois apesar de possuir uma alta capacidade de degradar a celulose e celobiose apresentou curva de crescimento em glicose completa em 6:30 h de incubação (Figura 3).

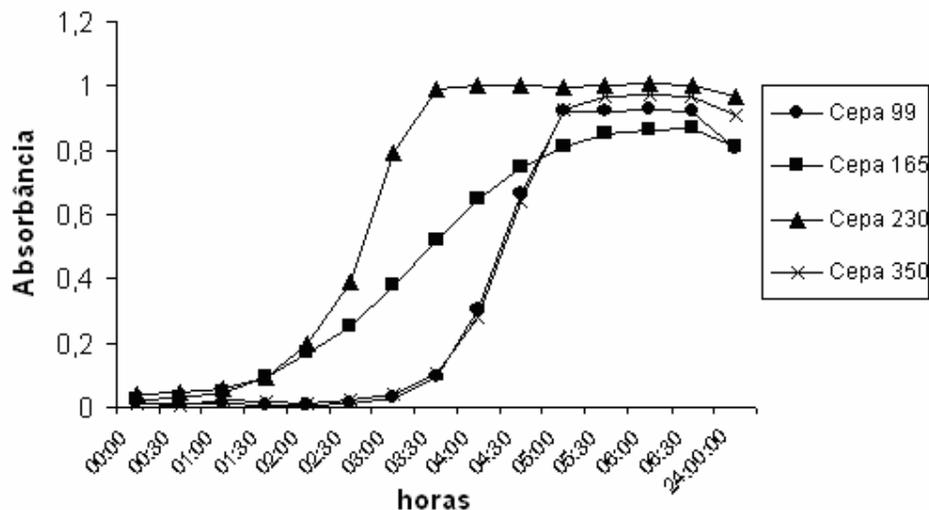


Figura 3- Representação gráfica da curva de crescimento de algumas cepas tolerantes ao produto à base de própolis LLOS.

As cepas bacterianas tolerantes ao produto LLOS que apresentaram um lag time maior, ou seja, estado de latência superior às 17 h, em geral, possuíram maior afinidade e capacidade para degradar a celulose, celobiose, arabinose e xilose do que os açúcares solúveis.

Porém, ainda foram registrados casos de cepas que preferencialmente degradam a glicose, mas tiveram período de latência superior a 37:00 h de incubação. Entre essas pode-se citar o isolado 97, tolerante a LLOSB3 provenientes de animais recebendo 100% de silagem de milho, que apresentou afinidade somente por açúcares solúveis e não cresceu satisfatoriamente, sem que possa ser sugerida uma razão para tal comportamento.

Verificando-se genericamente a atividade metabólica a qual foi medida pela curva de crescimento das cepas tolerantes ao produto LLOS, é possível confirmar que, de fato, a ação do produto à base de própolis não selecionou somente para um nível de atividade metabólica. As curvas de crescimento, analisadas como um todo, indicaram o uso potencial do produto LLOS na produção animal, pois observou-se diversidade dentre as bactérias tolerantes aos flavonóides nas concentrações testadas.

Em geral nos produtos LLOS estudados as cepas tolerantes que concluem a curva de crescimento em 6:30 h apresentam na sua maioria a forma de cocobacillus e as cepas tolerantes que pertencem ao grupo que possui maior fase de latência (lag time) apresentaram em sua maioria a forma morfológica de bastonete.

Conclusões

Os produtos LLOS à base de própolis selecionaram cepas de bactérias ruminais na maioria Gram-positiva indicando que a própolis possui mecanismo de ação diferente dos ionóforos. Os produtos LLOS também selecionaram a microbiota ruminal sem afetar a diversidade bacteriana e seus diferentes níveis de atividade metabólica. Havendo assim, necessidade de mais pesquisas sobre a composição de flavonóides dos produtos LLOS e testes a campo mais refinados.

Literatura citada

- ANTUNES, R.M.P.; CATAO, R.M.R.; CEVALLOS, B.S.O. Antimicrobial activity of propolis. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p.15-18, 1996.
- BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A. *et al.* In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. **Letters in applied Microbiology**, v. 31, p. 174-177, 2000.
- BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, n.3-4, p.263-277, 2000.
- BRYANT, M. P.; BURKEY, L. A. Cultural methods and some characteristics of some of the more numerous groups of bacteria in bovine rumen. **Journal of Dairy Science**. V.36 p.205, 1953.
- FRANCO, S. L. & BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p. 48-51, 1999.
- GOUET, F. E.; JOUANY, S. P. *et al.* L'écossystème microbien deu réticulo-rumen. In: **Nutrition des ruminants**. INRA editions, p. 299-348. 1995.
- HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. ed. Academic Press, New York, p. 533, 1966.
- HUNGATE, R. E. A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes. In: **Methods of Microbiology**. V.3B Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. Academic Press, New York, p.117, 1969.
- JOHNSON, M. J.; THATCHER, E.; COX, M. E. O. Techniques for controlling variability in Gram staining of obligate anaerobes. **Journal of Clinical Microbiology**, v:mar. p.755-758, 1995.
- LANA, R. P.; OLIVEIRA, J. S.; BORGES, A. C. *et al.* Efeito da monensina e lasolocida sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 724-730, 2002.
- ODENYO, A. A.; OSUJI, P. O. Tannin-tolerant ruminal bacteria from east African

- ruminants. **Canadian Journal of Microbiology**. V.44, n.9, p.905-909, 1998.
- PRADO, O. P. P. **Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2005, 78p.
- ROBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. ed. 2, p.523 – 632, 1997.
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, New York, p. 119, 2002.
- STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: **The rumen microbial ecosystem**, ed. 2, p.10 – 72, 1997
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R. P. *et al.* Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1093-1099, 2004.
- TAKAISI-KIKUNI N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medicine**, v.60, n.2, p.222-227, 1994.

Digestibilidade e parâmetros ruminais de dieta à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos

Resumo: Avaliaram-se produtos contendo própolis, LLOSB3 e LLOSC1, em duas concentrações de própolis (B e C) e duas extrações alcoólicas (1 e 3) e a monensina sódica em dieta à base de forragem sobre o consumo, digestibilidade total e parcial e características ruminais em bovinos. Utilizaram-se quatro bovinos da raça Holandesa, castrados, com peso corporal de 221 ± 21 kg, canulados no rúmen, em delineamento experimental quadrado latino 4 x 4. A dieta experimental foi constituída de 72,5% de volumoso e 27,5% de concentrado e apresentou 14,4% de PB e 67% de NDT, cujos tratamentos diferiram quanto a ausência e a presença de aditivos. Os consumos médios de MS e nutrientes não diferiram, exceto para o consumo de NDT que foi superior ($P < 0,05$) para a testemunha em relação aos demais tratamentos. O tratamento testemunha foi superior ($P < 0,05$) sobre a digestibilidade total da MS e dos nutrientes e a DT da FDN não diferiu entre a adição de monensina e própolis. Os maiores ($P < 0,05$) valores de digestibilidade ruminal e intestinal para MS, PB, FDN foi para o tratamento testemunha em relação aos aditivos. A inclusão de LLOSB3 refletiu em menor pH ruminal e maiores produções de acetato e AGV totais em relação à testemunha e monensina, não diferindo de LLOSC1. A monensina propiciou a menor razão acetato:propionato entre os tratamentos (3,65 vs 4,30). Não houve diferença para a concentração de amônia ruminal, porém a adição da própolis aumentou ($P < 0,05$) o fluxo de proteína para o intestino. Aumento do volume ruminal foi observado para adição de aditivos, porém estes tiveram efeito negativo sobre a concentração de energia digestível (NDT) de dietas à base de forragem fornecida para bovinos em crescimento.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, digestibilidade parcial, nitrogênio amoniacal, pH ruminal, taxa de diluição

Digestibility and ruminal parameters of diet based in roughage with the addition of propolis and monensin sodium for cattle

Abstract: There were evaluated the propolis based, LLOSB3 and LLOSC1 in two propolis concentrations (B and C) and two extractions alcoholic (1 and 3) and monensin sodium on roughage diet having on intake, total and partial digestibility and characteristics ruminal in cattle. It was used four Holstein cattle, castrated, with body weight of 221 ± 21 kg, with ruminal cannulas, in experimental design 4 x 4 Latin square. The experimental diet was composed of 72.5% roughage and 27.5% concentrate and had 14.4% CP and 67% of TDN, whose treatment differed as to the absence and presence of additives. The average intake of DM and nutrients did not differ, except for the intake of TDN that was higher ($P < 0.05$) for control in relation to others treatments. Treatment control was higher ($P < 0.05$) on total digestibility of DM and nutrients and TD of NDF did not differ between the addition of monensin and propolis. The highest ($P < 0.05$) values of ruminal and intestinal digestibility for DM, CP, NDF was to control treatment than for additives. The inclusion of LLOSB3 reflected in lower ruminal pH and higher production of acetate and VFA in comparison to the control and monensin, not differing from LLOSC1. Monensin gave the lowest acetate:propionate ratio between treatments (3.65 vs. 4.30). There was no difference in the concentration of ruminal ammonia but the propolis addition increased ($P < 0.05$) the protein flow to the intestine. The increase in ruminal volume was observed for additives addition, but they had negative effect on the concentration of digestible energy (TDN) from diets based in roughage for cattle in growth.

Key-words: ammonia nitrogen, partial digestibility, rate of dilution, ruminal pH, volatile fatty acids

Introdução

O rebanho bovino brasileiro é constituído de 159 milhões de cabeças, das quais cerca de 88% são terminados em regime de pastejo (Anualpec, 2007). Com a finalidade de diminuir perdas de energia e melhorar o ganho de peso de bovinos em pastejo a monensina sódica tem sido testada. Segundo Goodrich *et al.* (1984) bovinos em pastagens e suplementados com monensina ganharam 13,5% mais peso que o controle. Também, Nagajara (1997) observaram que bovinos a pasto recebendo monensina aumentaram o ganho de peso diário e a eficiência alimentar.

Todavia, o uso de ionóforos está proibido na União Européia desde 1º de janeiro de 2006 (Regulamento CE, 2003). Assim, a própolis vem sendo estudada como alternativa natural aos ionóforos utilizados na alimentação de ruminantes, pois possui inúmeras substâncias ativas em sua composição, destacando-se os flavonóides, que apresentam ação bacteriostática e bactericida, principalmente contra bactérias Gram-positivas (Antunes *et al.*, 1996).

Em estudos sobre a microbiota ruminal Broudiscou *et al.* (2000) testaram a própolis e observaram que aumentou a produção de propionato em 10,3% e diminuiu a população de protozoários. A própolis também foi eficiente em reduzir a produção de amônia de diferentes fontes de nitrogênio, tanto *in vitro* como *in vivo* (Oliveira *et al.*, 2006; Stradiotti Jr *et al.*, 2004).

Estudos com produtos contendo extrato de própolis LLOS (PI = nº 0605768-3) em diferentes extrações alcoólicas (1, 2 e 3) e concentrações de própolis (A, B, C e D) têm mostrado resultados positivos quando adicionados na ração de ruminantes. Prado (2005) avaliou LLOSC1, LLOSB3 e monensina sódica sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) de dieta com 100% de volumoso e verificou que a DIVMS aumentou em 10 unidades percentuais com a utilização o produto LLOSB3 e 6,4 unidades percentuais com o produto LLOSC1 em relação a monensina. No desempenho de bezerras Holandês Preto e Branco, lactentes, alimentadas do nascimento ao desmame (60 dias) com leite e concentrado, não houve efeito da substituição da lasalocida sódica pelos produtos contendo própolis LLOSC1 e LLOSA2 sobre o desempenho, conversão alimentar e digestibilidade das rações (Casimiro, 2008).

Assim, objetivou-se estudar os produtos LLOSB3 e LLOSC1 em duas extrações alcoólicas (1 e 3) e duas concentrações de própolis (B e C) e monensina sódica em dieta à base de forragem sobre o consumo, digestibilidade total e parcial e características ruminais em bovinos.

Material e métodos

O experimento foi realizado no setor de Bovinocultura de Corte da Fazenda Experimental de Iguatemi, no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal e no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Foram utilizados quatro bovinos, castrados, com peso corporal inicial de 221 ± 21 kg. Os animais foram fistulados no rúmen e mantidos em baias individuais cobertas, com piso de concreto, providas de comedouro e bebedouro.

Os animais foram alimentados com uma dieta com ração volumoso:concentrado de 72,5:27,5% e foram balanceadas para conter 67% de NDT e 14% de proteína bruta. A composição bromatológica e percentual dos alimentos e da ração total constam na Tabela 1. Os tratamentos experimentais diferiram somente para a inclusão ou não dos aditivos sendo denominados: testemunha (sem aditivo), monensina sódica, LLOSC1, LLOSB3.

Tabela 1 – Composição bromatológica e percentual dos alimentos e dieta experimental.

Alimentos	% MS	(% na MS)							% na dieta
		MO	PB	EE	FDN	FDA	CHOT	CNE	
Silagem de milho	34,47	95,17	7,48	2,38	60,19	36,66	85,31	25,12	55,25
Feno de tifton	93,97	95,41	5,17	0,77	82,79	42,22	89,47	6,69	17,25
Farelo de soja	91,68	93,57	50,37	2,09	10,66	10,33	41,11	30,45	9,70
Milho moído	90,65	98,78	8,83	3,09	15,42	4,03	86,87	71,45	15,30
Uréia	99,00	-	312,12	-	-	-	-	-	1,00
Óleo de soja	99,00	-	-	99,90	-	-	-	-	0,50
Sal mineral ¹	99,00	-	-	-	-	-	-	-	1,00
Dieta total (72,5:27,5) ²	60,49	93,23	14,38	2,62	50,93	29,16	79,85	28,92	100,00

¹Composição por kilo de sal mineral: 65,0 g de fósforo; 130,0 g de cálcio; 5,0 g de magnésio; 13,0 g de enxofre; 700 mg de ferro, 850 mg de cobre; 1000 mg de manganês, 120 mg de iodo e 80 mg de cobalto

²Relação volumoso:concentrado

Os produtos contendo própolis (LLOSC1 e LLOSB3) foram preparados de acordo com a metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999) em duas extrações alcoólicas (1 e 3) e duas concentrações de própolis (B e C), os quais estão patenteados com patrimônio intelectual sob o nº PI 0605768-3 e os teores de flavonóides totais em crisina, quantificados por Prado (2005) são de 0,018 mg/g de produto LLOSC1 e de 0,0011 mg/ g de produto LLOSB3. Esses produtos foram selecionados a partir dos estudos *in vitro* realizados anteriormente e que apresentaram maior valor de DIVMS em dietas com 100% de feno de tifton (Prado, 2005).

Para o fornecimento de monensina sódica foi utilizado o produto comercial Rumensin® que contém 10% do princípio ativo e a dose fornecida, de acordo com o fabricante, foi de 2 g do produto/animal/dia. As doses dos produtos contendo própolis (LLOS) foram calculadas de maneira que as concentrações de própolis avaliadas estivessem contidas também em 2 g de produto LLOS/animal/dia.

Todos os aditivos foram pesados em separado, embalados em papel higroscópico o qual continha 1g do aditivo. Os aditivos foram colocados diretamente no rúmen do animal através da cânula ruminal, no momento da alimentação matutina (8 h) e da vespertina (16 h) assegurando dessa forma o fornecimento da dose diária de 2 g de aditivo.

Cada período experimental foi de 21 dias (ao todo quatro períodos), sendo 14 dias para adaptação dos animais aos tratamentos e sete dias de coleta. Do primeiro ao quarto dia do período de coleta, foram amostrados, cerca de 400 mL de digesta omasal/dia, obtida por sucção do conteúdo omasal, por meio do orifício retículo-omasal, segundo técnica descrita por Leão *et al.* (2002). No primeiro dia foi realizada a coleta às 8 h, no segundo dia às 12 h, no terceiro dia às 16 h e no quarto dia às 20 h (perfazendo um total de quatro amostras por animal em cada período). Os dois últimos dias de coleta foram utilizados para a coleta de líquido ruminal e conteúdo ruminal para avaliar as características da fermentação. Os animais foram pesados no final de cada período de adaptação e de coleta para estimar o consumo de MS e de nutrientes em relação ao peso corporal (PC) dos animais.

Para determinação do pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV) o fluido ruminal foi coletado no quinto dia do período de coleta, via cânula ruminal, nos tempos zero, 2, 4, 6 e 8 horas após a alimentação da manhã. O pH foi determinado imediatamente após a coleta. Aproximadamente 50 mL foram acidificados com 1 mL de ácido sulfúrico 1:1 para posteriores determinações das concentrações de N-NH₃ e AGV.

Foi administrado no rúmen dos animais 30 g de Co-EDTA diluídos em 500 mL de água destilada antes da primeira alimentação e infundido em dose única para a determinação da taxa de passagem de líquidos (Uden *et al.*, 1980). Foram coletados cerca de 50 mL de líquido ruminal antes da infusão e a cada duas horas até completar 12 h e uma última coleta às 24 h após a administração do marcador.

No último dia de coleta de cada período, foram amostrados cerca de 1,5 kg de conteúdo ruminal (2 h após a alimentação), misturados a 500 mL de solução salina

0,9% (NaCl), homogeneizados em liquidificador, coados em tecido duplo e o filtrado armazenado a -20°C para ser processado de acordo com metodologia de Cecava *et al.* (1990). Para a determinação do fluxo omasal de proteína microbiana, foram utilizadas bases purinas, quantificadas conforme técnica descrita por Ushida *et al.* (1985). O fluxo total de N microbiano para o duodeno (g/dia) foi estimado pela divisão da razão N:purina bactéria pela razão N:purinas digesta duodenal e multiplicando esse quociente pelo fluxo total individual de N. A eficiência de síntese microbiana foi também expressa em g de N microbiano/kg de MO verdadeira degradada no rúmen (MOVDR).

Durante o período experimental, foram feitas pesagens diárias do alimento fornecido e das sobras que foram amostrados e armazenados. Todas as amostras de líquido e conteúdo ruminal foram armazenadas separadas em embalagens plásticas específicas, as quais foram previamente etiquetadas e congeladas a -20°C para posteriores análises químicas.

Para determinação dos fluxos diários de matéria seca (MS) no rúmen, intestino e nas fezes foi utilizado o óxido crômico (Cr_2O_3) como indicador externo. Foram fornecidas duas doses intra-ruminais diariamente (8 h e 16 h) de cinco gramas de óxido crômico, previamente, pesado e acondicionado em papel higroscópico, perfazendo um total de 10 g de Cr_2O_3 /dia. As concentrações de óxido de cromo nas amostras de digesta omasal e fezes foram determinadas por meio de espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nitro-perclórica (Kimura & Miller, 1957).

A dosagem de amônia nas amostras de líquido ruminal foi realizada pela técnica de Ferner (1965) modificada por Vieira (1980). O líquido de rúmen foi analisado para ácidos graxos voláteis pela metodologia descrita por Bock *et al.* (1991).

Os teores de MS, MO, PB e EE foram determinados segundo AOAC (1980) citados em Silva & Queiroz (2002). As determinações de fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA) foram conduzidas de acordo com Van Soest *et al.* (1991).

Para a quantificação dos carboidratos totais (CHT) e não estruturais (CNE), utilizaram-se às equações descritas por Sniffen *et al.* (1992): $\text{CHT} = 100 - (\% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas})$ e $\text{CNE} = 100 - (\% \text{PB} + \% \text{FDN} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas})$. Os valores de NDT observados foram calculados para as diferentes dietas pela equação: $\text{NDT} = \text{PBD} + \text{EED} * 2,25 + \text{CHTD}$, em que PBD = proteína bruta digestível, EED = extrato etéreo digestível e CHTD = Carboidratos totais digestíveis.

Os coeficientes de digestibilidade totais e parciais da MS e demais nutrientes foram calculados de acordo com as fórmulas descritas por Coelho da Silva e Leão (1979).

A taxa de passagem de líquido e as curvas de concentração ruminal do Co foram ajustadas ao modelo exponencial unicompartmental de Hungate (1966), citado por Colucci (1984): $Y_{Co} = A \times e^{(-k_1 \cdot t)}$ em que Y_{Co} = concentração do indicador no tempo t; A = concentração de equilíbrio do Co; k_1 = taxa de passagem ou de diluição do Co; e t = tempo de amostragem. Os parâmetros da dinâmica da fase líquida foram calculados de acordo com Colucci et al. (1990): Tempo de retenção no rúmen (h) = 1/ taxa de passagem de fluidos (%/h); Volume de líquido ruminal (L) = quantidade de Co fornecida (mg) /A; Taxa de fluxo ruminal (L/h) = $k_{1Co} \times VLR$; Taxa de reciclagem da fase líquida ruminal (nº de vezes/dia) = 24 h/TeR (calculada conforme Maeng & Baldwin, 1976).

Os dados foram analisados em delineamento experimental com quadrado latino 4 X 4 (quatro animais, quatro períodos e quatro tratamentos). As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas no (SAS) Sistema de Análises por meio de análise de variância no procedimento PROC GLM.

Para os valores de pH, N-NH₃ e AGV no líquido ruminal, procederam-se à subdivisão de parcelas experimentais em função dos tempos de amostragem. Foi utilizada a análise de regressão para as concentrações de pH, N-NH₃ e AGV do líquido ruminal em função do tempo após a alimentação da manhã (zero, 2, 4, 6, 8 horas) para cada tratamento e o efeito de hora foi desdobrado em polinômio ortogonal. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey considerando 5% o grau de significância e até 10% de probabilidade como tendência.

Resultados e discussão

Não houve efeito ($P > 0,05$) da inclusão de própolis e monensina sódica em dieta a base de forragens sobre os consumos de MS e demais nutrientes, exceto para o NDT cujo maior ($P < 0,05$) consumo foi para o tratamento testemunha (1,68% do PC) em relação aos aditivos, que não diferiram entre si. (Tabela 2). O consumo médio de MS foi de 2,5% do PC e da FDN foi de 1,26 % do PC. Segundo Mertens (1994), o consumo de FDN deveria ser próximo de 1,2% do PC/dia, para permitir suplementação adequada de concentrado e prevenir a limitação do consumo pelo enchimento do rúmen. Deste modo, permite supor que a concentração de fibra nas dietas (quantitativamente principal nutriente) não foi o fator limitante do consumo. Todavia, o menor consumo de NDT das

dietas com adição de própolis e monensina indicou que menos energia digestível foi disponibilizada para bovinos em crescimento alimentados com dieta à base de forragem.

Diminuição no consumo de MS de dietas com adição de monensina sódica tem sido demonstrada em diversos trabalhos como os de Vargas *et al.* (2001), Oliveira *et al.* (2005) e Loureiro *et al.* (2007). Segundo Nicodemo (2001), em dietas com alto teor de grãos, os ionóforos geralmente reduzem a ingestão de alimento em cerca de 8% a 10% e melhoram a conversão alimentar, mantendo ou aumentando o ganho de peso diário dos animais. Todavia, no presente experimento observou-se pequena redução numérica do consumo de MS para a monensina em relação à testemunha, em torno de 320 g. Também em dieta volumosa (80% volumoso e 20% concentrado) fornecida a bovinos e bubalinos, Beleze (2005) não observou diferença no consumo de MS com a adição de monensina sódica.

Tabela 2- Média, probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) para os consumos de matéria seca (MS) e nutrientes em bovinos alimentados com dieta à base de volumoso e diferentes aditivos contendo própolis LLOS¹ e monensina.

		Tratamento					CV
		Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3	P	
MS	Kg/dia	6,42	6,10	6,29	6,28	0,3036	3,431
	% PC	2,55	2,43	2,52	2,53	0,3423	3,718
MO	Kg/dia	5,99	5,68	5,86	5,85	0,2980	3,459
	% PC	2,37	2,26	2,35	2,36	0,3326	3,731
PB	Kg/dia	0,93	0,91	0,92	0,91	0,4382	1,978
	% PC	0,37	0,36	0,37	0,37	0,6081	2,466
EE	Kg/dia	0,17	0,16	0,17	0,17	0,3427	2,221
	% PC	0,07	0,06	0,07	0,07	0,4252	2,475
FDN	Kg/dia	3,27	3,04	3,18	3,18	0,2456	4,492
	% PC	1,30	1,21	1,28	1,28	0,2466	4,638
FDA	Kg/dia	1,87	1,74	1,82	1,82	0,2231	4,093
	% PC	0,74	0,70	0,73	0,74	0,2468	3,931
CHT	Kg/dia	5,1	4,8	5,0	5,0	0,2814	3,5837
	% PC	2,0	1,9	2,0	2,0	0,2959	3,4077
CNE	Kg/dia	1,86	1,81	1,83	1,83	0,4879	2,3572
	% PC	0,73	0,72	0,73	0,74	0,6435	2,6886
NDT	Kg/dia	4,24a	3,76b	3,75b	3,57b	0,0025	3,6727
	% PC	1,68a	1,50b	1,50b	1,44b	0,0116	4,4221

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%
¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

Semelhantes aos resultados observados, a adição de própolis nas dietas parece não ter efeito sobre o consumo de MS, como registrado, para vacas leiteiras (Stelzer *et al.* 2006), cabras leiteiras (Lana *et al.* 2007) e bezerras Holandês Preto e Branco lactantes

(Casimiro, 2008). Porém, Loureiro et al. (2007) observaram redução no consumo de MS em cordeiros alimentados com rações que continham 15 mg de extrato de própolis/kg de PC (0,28 kg/dia) e 30 mg de extrato de própolis/kg de PC (0,23 kg/dia) em relação à ração testemunha (0,36 kg/dia).

Houve efeito dos tratamentos ($P < 0,05$) sobre a digestibilidade total (DT) da MS e demais nutrientes estudados (Tabela 3). De modo geral, os aditivos reduziram os coeficientes de digestibilidade exceto para o CNE, que não diferiu entre tratamentos ($P > 0,05$). A monensina foi o aditivo que menos influenciou negativamente sobre a DT da MS e nutrientes, sendo a DT do EE semelhante ao observado para testemunha.

Os menores coeficientes de DT da MS, da fração fibrosa e demais nutrientes observados pelos tratamentos monensina, LLOSC1 e LLOSB3 podem ser devidos ao espectro de ação dos produtos contendo própolis e monensina sobre a microbiota ruminal. O modo de ação da própolis parece ser diferente dos ionóforos, porém não está totalmente elucidado. Estudos de Takaisi-Kikuni & Schilcher (1994) sugeriram que a atividade antibacteriana da própolis foi dada pela inibição da RNA-polimerase bacteriana e segundo Antunes *et al.* (1996) a ação bacteriostática e bactericida ocorreria principalmente contra bactérias Gram-positivas. Já o modo de ação básico dos ionóforos ocorre pela mudança no movimento de íons através das membranas de bactérias Gram-positivas, alterando o gradiente de prótons e, conseqüentemente, o pH dentro da célula o que resulta em lise da bactéria (Martin, 1998). Talvez o emprego de monensina e da própolis em dieta à base de forragem, para bovinos em crescimento, esteja selecionando e/ou diminuindo as bactérias celulolíticas (Oehem & Pickrell, 1999) e assim levando a um prejuízo na digestão da fração fibrosa que se apresentou em maior proporção na dieta, e conseqüentemente, diminuiu a DT da MS, MO, PB e carboidratos estruturais.

A diminuição da DT da MS causada pelos tratamentos LLOSC1 e LLOSB3 discorda do resultado observado por Prado (2005) que ao empregar os mesmos produtos contendo própolis sobre a DIVMS de dietas com 100% de volumoso, verificou valores superiores em 6,4 e 10 unidades percentuais em relação aos tratamentos com monensina e testemunha, respectivamente. A diferença na digestibilidade da MS entre ensaios de digestibilidade *in vivo* e *in vitro* pode ter sido influenciado pela diferença inerente a cada método.

Foi observado que a monensina diminuiu a DT da PB, fato que discorda do observado por Beleze (2005) que verificou aumento de DT da PB para o tratamento monensina em relação aos tratamentos testemunha e probiótico em dietas à base de

forragem. Borges *et al.* (2008) trabalharam com fêmeas bovinas em confinamento alimentadas com dietas 40:60 (volumoso:concentrado) com a adição de monensina, enramicina e controle, observaram que apesar de aumento numérico para DT da PB para monensina em relação às dietas enramicina e testemunha, não houve diferença entre elas.

Tabela 3 – Média, probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) para os coeficientes de digestibilidade aparente total e parcial em bovinos alimentados com dietas à base de volumoso e diferentes aditivos contendo própolis LLOS³ e monensina.

	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
Digestibilidade total (DT)						
MS (%)	63,2a	58,7b	56,4c	54,3d	0,0001	1,2898
MO (%)	64,2a	59,7b	57,6c	55,0d	0,0001	1,3231
PB (%)	65,4a	63,1b	59,7c	56,5d	0,0001	1,4953
EE (%)	82,0a	80,1a	75,3b	65,2c	0,0001	2,3190
FDN (%)	55,5a	49,3b	47,9b	45,5b	0,0017	3,8986
FDA (%)	54,8a	46,1b	44,8bc	40,1c	0,0003	4,2265
CHOT (%)	65,0a	60,2b	58,5bc	56,5c	0,0001	1,5083
CNE (%)	81,7	79,1	76,9	75,7	0,1431	4,1517
NDT	66,1a	61,9b	59,7c	57,1d	0,0001	1,2758
Digestibilidade ruminal (DR)						
MS ¹ (%)	42,9a	43,2a	37,8b	39,0b	0,0004	2,3605
MS ² (%)	67,9b	73,7a	67,1b	71,9a	0,0003	1,4523
MO ² (%)	82,1	86,9	82,9	88,7	0,0549	3,4813
PB ¹ (%)	24,0a	27,2a	16,3b	11,2c	0,0001	8,1973
PB ² (%)	36,7b	43,0a	27,3c	19,8d	0,0001	7,7981
FDN ¹ (%)	49,6a	48,5ab	42,7c	43,9bc	0,0078	4,4532
FDN ² (%)	89,5b	98,5a	89,1b	96,5ab	0,0097	3,2833
FDA ² (%)	82,1c	93,8a	85,7b	96,3a	0,0001	1,4893
CHOT ² (%)	91,0b	96,8ab	94,2b	102,5a	0,0134	3,4606
CNE ² (%)	93,2b	95,2ab	100,0ab	108,8a	0,0399	6,0761
Digestibilidade intestinal (DI)						
MS ¹ (%)	35,5a	27,2c	29,8b	25,0d	0,0001	2,4431
MS ² (%)	32,1a	26,3b	32,9a	28,1b	0,0003	3,4137
MO ² (%)	17,88	13,1	17,08	11,3	0,0549	19,9627
PB ¹ (%)	54,5a	49,3b	51,9ab	51,0b	0,0063	2,4402
PB ² (%)	63,3c	56,9d	72,7b	80,2a	0,0001	3,6199
FDN ² (%)	10,5a	1,5b	10,9a	3,5ab	0,0097	46,21337
FDA ² (%)	17,9a	6,2c	14,3b	3,7c	0,0010	12,6468
CHOT ² (%)	8,9a	3,2ab	5,7a	-2,6b	0,0134	86,9497
CNE ² (%)	6,7a	4,7ab	-0,03ab	-8,8b	0,0399	938,1813
Fluxo de PB (g/dia) ⁴	705,0b	658,7b	788,0a	812,5a	0,0004	3,2526

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. ¹ porcentagem do que chega ao compartimento. ² porcentagem do total digerido. ³LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3. ⁴ Fluxo de PB para o intestino (g/dia)

Para a DT do EE não houve diferença entre os tratamentos testemunha e monensina, seguidos dos tratamentos LLOSC1 e LLOSB3, que foram inferiores ($P < 0,05$) e diferiram entre si, sendo que LLOSB3 teve efeito negativo mais acentuado sobre a DT do EE. Esses resultados diferem dos encontrados por Lana et al. (2005), em cabras, cuja DT do EE não diferiu entre dietas controle e a presença de própolis. Talvez os produtos contendo própolis (LLOS) estejam atuando não só sobre as bactérias celulolíticas, mas também sobre as bactérias lipolíticas e, conseqüentemente, prejudicando a ação das lipases, que resultou em baixos valores para a DT do EE.

Os carboidratos não estruturais (CNE) que se apresentaram em menor concentração na dieta não tiveram sua digestibilidade influenciada pelos tratamentos ($P > 0,05$). Em estudos com cepas bacterianas tolerantes aos produtos LLOSC1 e LLOSB3 verificou-se que em sua maioria degradaram carboidratos solúveis como glicose, lactose e frutose (Prado, 2008).

Houve influência dos tratamentos para os valores de NDT ($P < 0,05$) e o tratamento testemunha refletiu no maior valor seguido dos tratamentos monensina, LLOSC1 e LLOSB3. Esses resultados foram conseqüência da diminuição da digestibilidade dos nutrientes, PB, EE, FDN que foram influenciados pela seleção e inibição de bactérias celulolíticas e lipolíticas pela inclusão dos aditivos. Vale ressaltar que o valor de NDT para o tratamento testemunha foi próximo ao pré-estabelecido para bovinos em crescimento (NRC, 2001) e a adição de monensina e própolis reduziram os teores de NDT das rações.

Quanto à digestão da PB, é desejável que a maior parte aconteça na fração intestinal, pois não há absorção de aminoácidos no rúmen e os coeficientes de digestibilidade lá registrados são perdas de proteína na forma de amônia. Da mesma maneira, é desejável que haja digestão intestinal de CNE (amido) com produção de glicose, visto que esse composto provê mais energia ao animal se absorvido no intestino do que os AGV resultantes da fermentação dos CNE no rúmen, segundo cálculos teóricos feitos por Owens *et al.* (1986). Assim, os resultados da digestão ruminal e intestinal mostraram que a dieta utilizada pode ter refletido em desbalanço entre fontes de nitrogênio e carboidratos e resultado em perdas no rúmen, principalmente de proteína, refletido nos valores elevados e positivos de DR da PB (Tabela 3).

As fontes de N de alta degradabilidade ruminal (proteína das forragens e uréia), e as fontes de lenta degradação ruminal como os carboidratos estruturais das forragens (celulose) e do amido (milho), pode ter ocasionado as perdas de PB pela absorção de

amônia pela parede do rúmen. Ainda, indícios de não sincronização das dietas puderam ser observados pelo comportamento das curvas de N-NH₃, pH e AGV totais em função das horas após a alimentação. O ponto máximo de produção de N-NH₃ foi às 2,14 h (Figura 1); a concentração máxima de AGV totais foi às 3,9 h (Figura 2) e o pH foi mínimo às 4,8 h (Figura 1). Assim, é provável que a maior disponibilidade de nitrogênio amoniacal não coincidiu com a máxima disponibilidade de energia (ATP) e esqueletos carbonados aumentando a concentração de N-NH₃ no rúmen o que resultou em absorção e não favoreceu a síntese de proteína microbiana. Todavia, mesmo nessas condições os tratamentos contendo LLOB3 (11,2%) e LLOSC1 (16,3%) destacaram-se por minimizar essas perdas ruminais, a qual foi maior para o tratamento contendo monensina (27,2%) seguido do tratamento testemunha (24,0%).

Em relação a DR da fração fibrosa da parede celular, quando expressa como porcentagem do total digerido, indicou maior fermentação ($P < 0,05$) da FDN e da FDA para os tratamentos monensina seguido de LLOB3, LLOSC1 e a testemunha apresentou menor valor. Entretanto, quando a DR da FDN foi expressa como % do que chega no compartimento, os resultados acompanharam em parte aqueles obtidos para a DT da fibra, sendo que a testemunha e monensina apresentaram os maiores valores e não diferiram entre si. Porém a diminuição da DR da FDN observada para LLOSC1 e LLOB3 em relação à testemunha pode ter sido causada não só pela seleção de bactérias como também pela provável redução na população de protozoários, na presença de própolis, como observado por Broudiscou *et al.* (2000) e os protistas foram responsáveis por 19% a 28% da atividade total da celulase no ambiente ruminal. Outros estudos confirmaram que a defaunação reduz a digestão de fibras (Bonhomme 1990).

As diferenças na DR da FDA observadas para LLOB3 em relação a LLOSC1 ($P < 0,05$) pode ser reflexo das bactérias que foram selecionadas por esses produtos. Prado (2008) observou que algumas cepas de bactérias tolerantes a LLOB3 tiveram preferência para degradar celulose, como também degradaram celobiose, xilose e arabinose, e as cepas tolerantes a LLOSC1 conseguiram degradar diferentes substratos inclusive celulose, porém mais lentamente, e nem todas cepas demonstraram capacidade celulolítica, assim a variação observada na resistência das cepas aos produtos contendo própolis pode ter contribuído para a maior (LLOB3) e a menor (LLOSC1) DR da FDA.

Considerando os eventos nos intestinos, verificou-se que a DI da PB (% do que chega ao intestino) foi maior ($P < 0,05$) para o tratamento testemunha que não diferiu de

LLOSB3 e este por sua vez não diferiu da monensina e de LLOSC1. Esses resultados mostraram que o produto LLOSB3 foi o que influenciou menos negativamente na digestibilidade intestinal da proteína provendo aminoácidos ao animal semelhante à testemunha, o mesmo não aconteceu com a monensina sódica e LLOSC1 que foram inferiores a testemunha.

Valores negativos foram encontrados para a DI dos CNE (% do total digerido) como reflexo dos dados de digestibilidade observados no rúmen (maior que 100%), fato que não era esperado, assim esses valores podem ter sido ocasionados por erro de execução da técnica de coleta omasal e pela baixa quantidade de carboidratos solúveis que chegou aos intestinos (Tabela 3).

Não houve efeito da interação tratamento x horário de coleta após a alimentação, para pH e N-NH₃ no rúmen de bovinos alimentados com dieta volumosa e aditivos (P>0,05), porém, houve efeito do horário de coleta (P<0,05) sobre o pH e nitrogênio amoniacal (Figura 1) e dos tratamentos (P<0,05) sobre o pH (Tabela 4).

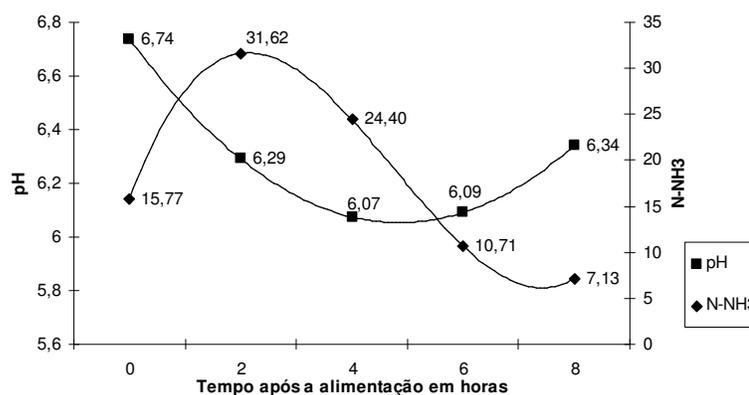


Figura 1 – pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) mg/100 mL do líquido ruminal de bovinos em função do tempo após a alimentação com dieta volumosa contendo diferentes aditivos LLOS contendo própolis e monensina

O pH ruminal de bovinos em função das horas após alimentação apresentou comportamento quadrático e demonstrou valor mínimo de 6,04 às 4,8 h ($pH = 0,029H^2 - 0,2820H + 6,73824$ $R^2=1,00$; onde H=hora). O menor valor de pH (P<0,05) foi para o tratamento LLOSB3 (6,18) em relação a monensina, e não diferiu da testemunha e de LLOSC1 (Tabela 4). Segundo Russell & Dombrowski (1980), o crescimento das principais bactérias celulolíticas é comprometido em pH em torno de 6,0 a 6,1, sendo

totalmente inibido em valores abaixo de 5,9. Entretanto, como a dieta foi à base de forragem e dependente da atuação das bactérias celulolíticas, o pH pode não ter sido a causa do efeito negativo sobre a DR da FDN (% do que chega no rúmen) observado para o LLOSB3, LLOSC1 quando comparado aos tratamentos testemunha e monensina, que não diferiram entre si.

Não foi observado efeito no pH ruminal ($P > 0,05$) entre os tratamentos testemunha e monensina o que concorda com Rodrigues *et al.* (2007) que não encontraram variações de pH entre as rações testemunha e a que continha monensina sódica em bovinos alimentados com forragem de baixo valor nutritivo. O valor mínimo de pH observado as 4,8 h após alimentação estão em acordo com Gomes (1991) o qual relatou que o pH ruminal alcança seu valor mais baixo de 2 a 6 h após a ingestão de alimento.

O comportamento em função do tempo após a alimentação sobre o nitrogênio amoniacal em bovinos foi cúbico ($NH_3 = 0,3456H^3 - 4,9566H^2 + 16,454H + 15,774 R^2 = 0,97$; onde H= hora) e mostrou valor máximo às 2,14 h e mínimo às 7,4 h (Figura 1).

O valor máximo de produção de N-NH₃ foi de 31,67 mg/100 mL de líquido ruminal e superior as concentrações de 19 a 23 mg N-NH₃/100 mL sugerida por Mehers *et al.* (1977) para que ocorra máxima atividade fermentativa. Na concentração observada, ocorreram perdas de N-NH₃, que podem ser comprovadas pelos altos coeficientes de DR da PB em todas as dietas. A produção e a absorção excessiva de amônia pode aumentar a excreção de N e o custo energético pela produção da uréia no fígado (Russell *et al.* 1992).

O valor mínimo de N-NH₃ no rúmen, independente do tratamento, foi de 6,15 mg N-NH₃ /100 mL de líquido ruminal e a concentração média foi de 10,64 NH₃ /100 mL de líquido (Tabela 4). O menor valor ficou acima do mínimo requerido para que haja fermentação ruminal que é de 5,0 mg N-NH₃/100 mL (Satter & Styler, 1974) e o valor médio abaixo da concentração sugerida para que atividade de fermentação seja máxima (Mehers *et al.*, 1977). Ainda, a ausência de diferença entre tratamentos para concentrações de amônia no rúmen e para o consumo de proteína (Tabela 2) e os menores valores de DR da PB registrados para os produtos LLOSB3 e LLOSC1, mostraram que a própolis foi mais efetiva em reduzir as perdas de N-NH₃ e aumentou ($P < 0,05$) o fluxo de PB para os intestinos (Tabela 3).

Não houve interação de tratamento x horário de coleta, porém, houve efeito do horário de coleta ($P < 0,05$) após a alimentação para concentração dos AGV, cujos dados em relação ao tempo foram ajustado ao modelo quadrático (Figura 2). Também se

registrou efeito de tratamentos ($P < 0,05$) sobre as concentrações de AGV e para a razão acetato:propionato (Tabela 4).

Tabela 4 – Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal e produção de ácidos graxos voláteis para bovinos alimentados com dieta volumosa contendo ou não aditivos à base de própolis LLOS¹ e monensina.

	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
pH	6,37ab	6,43a	6,24ab	6,18b	0,0145	4,06
N-NH ₃ (mg/100 mL)	10,32	9,44	11,29	11,54	0,8470	43,95
AGV total (μM/mL)	81,22b	80,97b	89,90ab	95,04a	0,0029	15,78
Acetato (μM/mL)	59,03b	57,08b	64,85ab	69,28a	0,0002	14,84
Propionato (μM/mL)	14,40	16,10	15,37	16,44	0,1682	20,80
Butirato (μM/mL)	7,79	7,79	9,07	9,31	0,1628	32,93
Ace:Prop	4,23 a	3,65b	4,33a	4,35a	0,0035	13,20

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

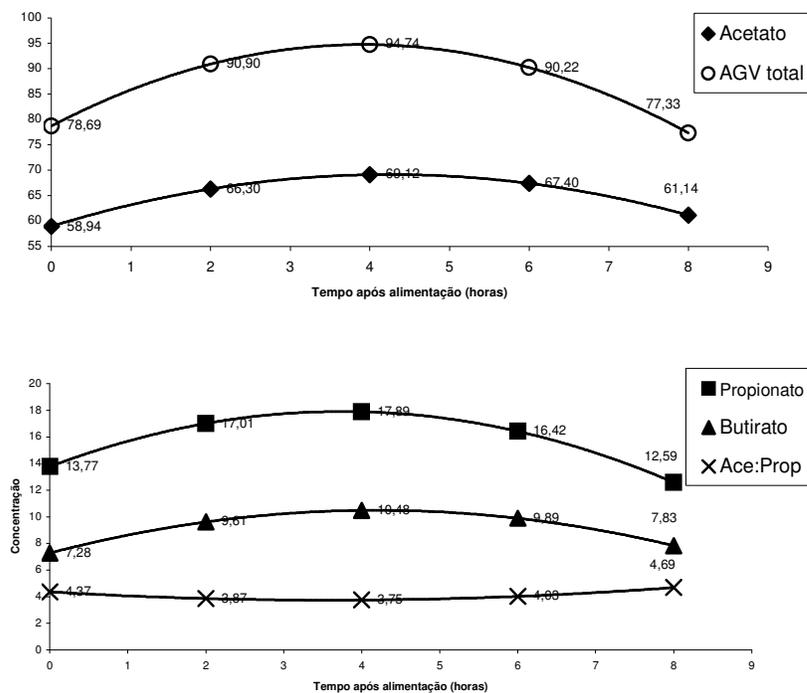
¹LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

A concentração máxima para os AGV variou entre 3,7 e 4,1 h após a alimentação e a menor razão acetato:propionato ficou entre 3,5 e 3,7 h após a alimentação, independente dos tratamentos. O valor máximo para AGV totais foi de 94,74 μM/mL, superior ao valor encontrado por Lana & Russell (2001) de 72,00 μM/mL, que incubaram bactérias ruminais de bovinos alimentados exclusivamente com feno de gramínea por 24 h *in vitro*.

A maior concentração de acetato e de AGV totais ($P < 0,05$) foi verificada para LLOSB3 em relação a monensina e testemunha e o tratamento LLOSC1 não diferiu. A monensina apresentou as menores concentrações de AGV totais e acetato, e a menor ($P < 0,05$) razão acetato:propionato (3,65) comparando-se aos demais tratamentos.

Contudo, analisando as produções de acetato e propionato, separadamente, os resultados diferem dos observados por Rodrigues *et al.* (2007) que ao avaliarem monensina sódica em bovinos alimentados com volumoso de baixa qualidade, observaram aumentos na concentração de propionato em relação ao controle. No presente trabalho, observou-se que a melhora da razão acetato:propionato obtida para monensina foi mais influenciada pela diminuição da produção de acetato ($P > 0,05$) uma vez que não houve diferença na produção de propionato entre as dietas. Segundo Newbold *et al.* (1995) reflexos positivos no ganho de peso de animais a pasto consumindo ionóforos poderiam estar relacionados ao aumento da energia

metabolizável propiciado pela redução na produção de acetato e conseqüente diminuição da metanogênese, que compensaria a perda na digestibilidade da fibra.



$$AGVt = 78,691 + 8,1952H - 1,0457H^2 \quad R^2=0,83; \quad Ace = 58,943 + 4,8141H - 0,5674H^2 \quad R^2=0,80; \quad Prop = 13,765 + 2,2117H - 0,2949H^2 \quad R^2=0,84; \quad But = 7,2776 + 1,5342H - 0,1831H^2 \quad R^2=0,89; \quad Ace:prop = 4,3679 - 0,347H + 0,0484H^2 \quad R^2=0,90.$$

Figura 2 – Concentração de ácidos graxos voláteis totais (AGVt); acetato; propionato; butirato em $\mu\text{M/mL}$ do líquido ruminal de bovinos e razão acetato:propionato em função do tempo após a alimentação para dietas volumosas contendo diferentes aditivos LLOS à base de própolis e monensina

A dinâmica da fase líquida tem efeito sobre o crescimento microbiano e sempre que a taxa de diluição aumenta se eleva às condições pra o crescimento microbiano o que melhora os processo de digestão até certo ponto (Van Soest, 1994). Entretanto, não foi observado efeito da interação e dos tratamentos ($P>0,05$) sobre a taxa de passagem de líquido, taxa de reciclagem e taxa de fluxo líquido, porém houve diferença ($P<0,05$) para tratamentos quanto ao volume ruminal (Tabela 5).

Entretanto, para o tratamento LLOSC1 verificou-se tendência de maior taxa de diluição ($P<0,07$) que se apresentou próximo a aquela encontrada por Martins *et al.* (2006) de 9,84%/h para bovinos alimentados com dieta volumosa e adição de enzimas fibrolíticas. Por outro lado, o LLOSB3 resultou em menor taxa de diluição e a

observada para monensina (8,1%/h) foi inferior a encontrada por Amaro *et al.* (2002) de 9,23%/h quando utilizaram 200 mg de lasalocida sódica/animal/dia.

Tabela 5- Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de taxa de passagem de líquido (TP, %/hora), tempo de retenção (TeR, horas), taxa de reciclagem (TRec, vezes/dia), taxa de fluxo líquido (TF, litros/hora) e volume ruminal (VR, litros e % do peso corporal) para produtos LLOS contendo própolis e monensina em bovinos

Variável	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
TP (%/hora)	7,5	8,1	9,4	6,8	0,0728	14,3198
TeR (horas)	14,6	12,5	11,0	14,2	0,1487	15,9581
TRec (vezes/dia)	1,8	1,9	2,2	1,6	0,0841	13,9795
TF (L/hora)	4,4	4,8	5,2	4,2	0,3744	16,9091
VR (L)	50,5b	59,5a	56,7ab	62,2a	0,0048	4,8376
VR (% PV)	20,0b	23,6a	22,6ab	25,5a	0,0046	5,2098

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%
¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

Da mesma forma, a taxa de reciclagem de líquido apresentou tendência ($P < 0,08$) de aumento para o LLOSC1 (2,2 vezes/dia) em relação a LLOSB3 que apresentou o menor valor (1,6 vezes/dia) entre os tratamentos. Em termos de valor médio a taxa de reciclagem, dos tratamentos contendo ou não aditivos, foi de 1,9 vezes/dia e próximo ao valor relatado por Berchielli *et al.* (1996) de 2,0 vezes/dia.

O tempo de retenção da fase líquida é inferior a 24 horas e freqüentemente menor que 12 horas (Van Soest, 1994) e para os tratamentos avaliados o tempo médio de retenção de líquido observado foi 13 horas, sem diferença ($P > 0,05$) entre eles.

O maior volume ruminal é verificado quando os animais são alimentados com dietas à base de forragem em relação a dietas concentradas e a redução do volume ruminal foi associada ao emprego de lasalocida sódica em bovinos (Wessels *et al.* 1996). No entanto, os tratamentos contendo monensina e própolis aumentaram o volume ruminal ($P < 0,05$) em litros e % do peso, em relação à testemunha. O aumento do volume ruminal pela inclusão de aditivos seguiu ordem de magnitude à produção de acetato e AGV totais (Tabela 4), o tratamento LLOSB3 apresentou a maior produção desses ácidos e também o maior volume ruminal seguido pelo LLOSC1 e monensina sódica e os valores registrados foram superiores aos considerados ideais por Owens & Goestch (1988) de 15% a 21% do PC.

O teor médio de MO das bactérias ruminais de 79,0% (Tabela 6) foi superior a valor encontrado por Cabral *et al.* (2008) de 72,9% em dietas à base de volumoso; porém próximo ao descrito por Clark *et al.* (1992) de 77,5%.

O teor médio de N das bactérias ruminais de 6,7% apresentou-se inferior ao teor encontrado por Cabral *et al.* (2008) que foi de 8,89%.

Houve efeito ($P < 0,05$) dos tratamentos sobre o fluxo omasal de MO, porém o fluxo omasal de MO microbiana não diferiu (Tabela 6). Observou-se que o tratamento LLOSC1 apresentou maior fluxo de MO e de N para o omaso que foi de 3059,6 g/dia. Esse maior fluxo está em acordo com os maiores valores numéricos para a taxa de diluição apresentada pela dieta contendo LLOSC1 que foi de 9,4%/h (Tabela 5) e também menor tempo de retenção no rúmen (11 h).

Tabela 6 – Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de teores de MO, nitrogênio total e purinas de microrganismos ruminais, ingestões de matéria orgânica (IMO) e nitrogênio (IN), fluxos de MO, MO microbiana, N microbiano (N-mic), N não microbiano (NN-Mic) no omaso, MO aparentemente degradável no rúmen (MOADR) e MO verdadeiramente degradável no rúmen (MOVDR) e eficiência de síntese microbiana aparente e verdadeira para tratamentos contendo ou não produto LLOS à base de própolis e monensina em bovinos

	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
MOmic	76,06	82,08	78,98	78,73	0,4031	5,8746
Nmic	6,89	6,83	6,86	6,40	0,6154	8,6947
N em % da MO	9,09	8,31	8,71	8,11	0,4204	10,1893
RNA (g/kg)	0,1276	0,1211	0,1488	0,1348	0,1028	9,9154
IMO g/dia	5985,7	5680,5	5863,5	5852,8	0,2980	3,4592
IN g/dia	148,5	144,9	146,5	146,3	0,4382	1,9779
	Fluxo para o omaso					
MO g/dia	2825,0bc	2732,0c	3059,6a	2997,2ab	0,0045	2,8366
MO microbiana g/dia	1556,8	1595,2	1499,2	1568,0	0,6530	6,6042
N g/dia	112,8b	105,4b	126,1a	130,0a	0,0004	3,2526
N-Mic g/dia	142,2	135,1	129,1	128,64	0,3987	7,6669
NN-Mic g/dia	-29,5b	-29,6b	-3,0ab	1,4a	0,0191	59,2045
MOADR (g/dia)	3157,6	2948,5	2803,9	2855,6	0,1590	6,7463
MOVDR (g/dia)	4714,4	4543,8	4162,4	4423,6	0,1563	5,0693
	Síntese microbiana					
g N-Mic/kg MOADR	44,6	46,4	48,6	45,4	0,7595	11,7091
g N-Mic/kg MOVDR	29,8	29,3	31,2	28,9	0,7349	9,7670

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

Não houve efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) sobre a eficiência de síntese microbiana em bovinos (Tabela 6). Embora o tratamento testemunha tivesse maiores coeficientes de digestibilidade total e ruminal, principalmente, em relação aos tratamentos contendo produtos à base de própolis, estes fatos não refletiram na síntese microbiana. As médias

da síntese microbiana para os tratamentos foram de 46,3 g N-Mic/kg MOADR e de 29,8 g N-Mic/kg MOVDR, as quais foram inferiores ao encontrado por Veras *et al.* (2008) de 33,56 g N-Mic/kg MOVDR que trabalharam com bovinos nelore recebendo dietas com 25% de concentrado. Porém os valores encontrados no presente experimento foram superiores aos encontrados por Maeda (2007) de 35,5 g N-Mic/kg MOADR e 24,6 g N-Mic/kg MOVDR em bovinos alimentados com dietas 60:40 (volumoso: concentrado) à base de silagem de cana.

Conclusões

Os produtos contendo própolis e monensina sódica tiveram efeitos negativos sobre os processos de digestão que refletiram em menores teores de nutrientes digestíveis totais para bovinos em crescimento alimentados com dietas à base de forragem.

Mais estudos são necessários para investigar os efeitos dos ionóforos e das concentrações de própolis em dietas à base de forragem, pois a monensina resultou na menor razão acetato:propionato que reflete mais energia metabolizável para o animal e os produtos contendo própolis LLOSC1 e LLOSB3 propiciaram maior fluxo de proteína para os intestinos porém com efeitos diversos nas características ruminais.

Literatura citada

- ANTUNES, R. M. P.; CATAO, R. M. R.; CEVALLOS, B. S. O. Antimicrobial activity of propolis. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.77, p.15-18, 1996.
- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - ANUALPEC 2007. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2007. 340 p.
- BERCHIELLI, T. T.; RODRIGUEZ, N. M.; GONÇALVES, L. C. Polietilenoglicol e cobalto-EDTA como marcadores da fase líquida ruminal. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.48, p.463-471, 1996.
- BELEZE, J. F. R. **Digestibilidade e parâmetros ruminais de rações com teores de concentrado e adição de ionóforos ou probiótico para bovinos e bubalinos**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005.161p. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- BOCK, B. J.; HARMON D. L.; BRANDT Jr R. T. *et al.* Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. **Journal of Animal Science**. v.69, p.2211–2224, 1991.
- BORGES, L. F. O.; PASSINI, R.; MEYER, P. M. *et al.* Efeitos da enramicina e monensina sódica sobre a digestão de nutrientes em bovinos alimentados com dietas contendo alto nível de concentrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.4, p.674-680, 2008.
- CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E. *et al.* Eficiência microbiana e parâmetros ruminais em bovinos alimentados com dietas à base de volumosos tropicais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.5, p.919-925, 2008.

- CLARK, J.H.; KLUSMEYER, T.H.; CAMERON, M.R. Microbial proteins synthesis and flows of nitrogen fractions to the duodenum of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.8, p.2304-2323, 1992.
- CASIMIRO, T. R. **Produtos a base de própolis para bezerras lactentes**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)- Universidade Estadual de Maringá, 2008.
- CECAVA, J. M.; MERCHEN, N. R.; GAY, L. C. *et al.* Composition of ruminal bacteria harvested from steers as influenced by dietary energy level, feeding frequency, and isolation technique. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.9, p.2480-2488, 1990.
- COLUCCI, P.E. **Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle**. Guelph:University of Guelph, 1984, 221p. Thesis (Ph.D. Thesis Animal Science) - University of Guelph, 1984.
- COLUCCI, P. E.; MACLEOD, G. K.; GROVUM, W. L.; *et al.* Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. **Journal of Dairy Science**. v.73, n.8, p.2143-2156, 1990.
- BONHOMME, A. Rumen ciliates: Their metabolism and relationships with bacteria and their hosts. **Animal Feed Science and Technology**. v .30, p.203-266, 1990.
- BROUDISCOU, L. P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A. F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, n.3-4, p.263-277, 2000.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba, S.P, Livrocere. 1979. 380p.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p. 48-51, 1999.
- GOMES, B.V. **Influência das características químicas e físicas das forragens sobre o consumo, degradação e cinética da digesta ruminal**. Viçosa, MG:UFV, 1991. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1991.
- 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, n.6, p.1484-1498, 1984.
- KIMURA, F.T.; MILLER, V.L. Chromic oxide measurement. Improved determination of chromic oxide in cow feed and feces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.5, p.216, 1957.
- LANA, R. P.; RUSSELL, J.B. Efeitos da Monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de ovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.254-260, 2001.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; RODRIGUES, M. T. *et al.*, Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras: consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.191-197, 2007.
- LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; AZEVADO, J. A. G. *et al.* Técnica de coleta de digesta omasal para estudos de digestão parcial em bovinos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECCIA, 39. Recife, 2002. **Anais...** Recife:SBZ, [2002] (CD ROM).

- LOUREIRO, C. M. B.; SOBRINHO, A. G. S.; SANTANA, A. E. *et al.*, Eficácia do extrato de própolis no controle de helmintoses de cordeiros naturalmente infectados. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44. Jaboticabal, 2007. **Anais...** Jaboticabal:SBZ, [2007] (CD ROM).
- MAEDA, E. M. **Caracterização química, digestibilidade e degradabilidade de silagem de cana-de-açúcar com diferentes aditivos em bovinos e bubalinos.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. 96p. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Estadual de Maringá, 2007.
- MAENG, W.J., BALDWIN, R.L. 1976. Dynamics of fermentation of purified diet and microbial growth in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.4, p.636-642.
- MARTIN, S.A. Manipulation of ruminal fermentation with organic acids: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, n.12, p.3123-3132, 1998.
- MARTINS, A. S.; VIEIRA, P. F.; BERCHIELLI, T. T. *et al.* Consumo e digestibilidade aparente total em bovinos sob suplementação com enzimas fibrolíticas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.5, p.2118-2124, 2006.
- MEHERS, A. Z.; ORSKOV, E. R. A study of the artificial fiber bag technique for determining the digestibility of feeds in the rumen, **Journal of Agriculture Science**. v.88, p.645-650, 1977.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR., G.C. (Ed.). **Forage quality, evaluation and utilization.** Winsconsin: American Society of Agronomy. 1994.
- NAGAJARA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. Manipulation of ruminal fermentation In:HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (eds). **The Rumen Microbial Ecosystem.** Blackie academic e professional. London, p.523-632, 1997.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.
- NEWBOLD, C.J.; WALLACE, R.J.; CHEN, X.B. *et al.* Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers *in vitro* and in sheep. **Journal of Animal Science**. v.73, n.2, p.129-134, 1995.
- NICODEMO, M.L.F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte.** Documentos 106. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte. 54 p. 2001.
- OEHEM F. W.; PICKRELL. J. An Analysis of the Chronic Oaral Toxicity of Polyether Ionophore Antibiotics in Animals. **Veterinary and Human Toxicology**. v.41, p.251-257, 1999.
- OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N. *et al.* Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia** . v.34, n.5, p.1763-1774, 2005.
- OLIVEIRA, S. J.; QUEIROZ, S. A.; LANA, P. R. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p. 275-281, 2006.
- OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. Ruminal fermentation In: CHURCH, D. C. **The Ruminant Animal Physiology and Nutrition.** Englewood cliffs. O & Books Inc., 1988. p.146-171.

- OWENS, F. N.; ZINN, R. A.; KIM, Y.K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, v.63, p.1634-1648, 1986.
- PRADO, O. P. P. **Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2005, 78p.
- PRADO, O. P. P. **Própolis e monensina sódica em dietas volumosas sobre a digestibilidade e características ruminais de bovídeos** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, 2008, 98p.
- REGULAMENTO (CE) N.º1831/2003 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 22 de setembro de 2003 relativo aos aditivos destinados à alimentação animal **Jornal Oficial da União Europeia L 268/29**, 18.10.2003.
- RODRIGUES, P. H. M.; PERIXOTTO JUNIOR, K. C.; MORGULLIS, S. C. F. *et al.* Avaliação da monensina administrada pela forma convencional ou dispositivo de liberação lenta (bólus) em bovinos alimentados com forragens de baixo valor nutritivo e suplementados ou não com uréia. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, n.6, p.1937-1944, 2007.
- RUSSELL, J. B.; CONNOR, J.D.; FOX, D. G. *et al.* A net carbohydrate and protein systems for a evaluating cattle diets. 1. Ruminal fermentation. **Journal of Animal Science**, v.70 p.3551-3561, 1992.
- RUSSELL, J. B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by culteres of rumen bacteria in continous culture, **Applied and Environmental Microbiology**. v.39, p.604, 1980.
- RUSSELL J. B.; STROBEL, H. J. Effect of Ionophores on Ruminal Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, p.1-6, 1989.
- SAS **Procedures guides**. Version 6. Cary [Estados Unidos] : SAS. Institute.
- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **Britanic of Journal Nutrition**, v.32, n.2, p.199-205. 1974.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos**. 3.ed. UFV: Imprensa Universitária, 2002. 235p.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P.J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, n.12, p.3562-3577, 1992.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R.P. *et al.* Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004.
- STELZER, F. S.; LANA, R. P.; CAMPOS, J. M. S. *et al.* Efeito de níveis de concentrado e própolis sobre o desempenho de vacas leiteiras. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43. Recife, 2006. **Anais...** Recife:SBZ, [2006]. (CD-ROM)
- TAKAISI-KIKUNI N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial

- action of a defined propolis provenance. **Planta Medicine**, v.60, n.2, p.222-227, 1994.
- UDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.31, n.7, p.625-632, 1980.
- USHIDA, K.; LASSALAS, B.; JOUANY, J. P. Determinations of assay parameters of RNA analysis in bacterial and duodenal samples by spectrophotometry. Influence of sample treatment and preservation. **Reproduction Nutritional Development**, v.25, p.1037-1046, 1985.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, p. 476, 1994.
- VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; MANCIO, A.B. *et al.* Influencia de Rumensin, óleo de soja e níveis de concentrado sobre os consumo e os parâmetros fermentativos ruminais em bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.5 p.1650-1658, 2001.
- VERAS, R. M. L.; VALADARES FILHO, S. C.; AZEVEDO, J. A. G. *et al.* Níveis de concentrado na dieta de bovinos Nelore de três condições sexuais: consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana e parâmetros ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.37, n.5, p.951-960, 2008.
- VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminante**. Viçosa, MG:UFV, 1980.98p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa, 1980.
- WESSELS, R.H.; TITGEMEYER, E.C.; ARMENDARIZ, C.K. *et al.* Lasalocid effects on ruminal degradation of protein and postruminal supply of amino acids in Holstein steers. **Journal of Dairy Science**, v.79, p.1802-1808, 1996.

Digestibilidade e parâmetros ruminais de dieta à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bubalinos

Resumo: Objetivou-se estudar o efeito da administração dos produtos contendo própolis LLOSB3 e LLOSC1 em duas concentrações de própolis (B e C) e duas diferentes extrações alcoólicas (1 e 3) e monensina sódica sobre o consumo, digestibilidade total e parcial, e características ruminais em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. Utilizaram-se quatro búfalos castrados, da raça Murrah com peso médio de $459,3 \pm 44,5$ kg em delineamento experimental quadrado latino 4×4 (4 tratamentos: testemunha, monensina, LLOSC1 e LLOSB3 e 4 períodos). A dieta continha 80% de volumoso (silagem de milho e feno de Tifton) e 20% de concentrado, com 11,1% de PB e 66% de NDT. Os consumos de MS e demais nutrientes estudados não diferiram ($P > 0,05$) entre os tratamentos testados. A adição de LLOSC1 propiciou maiores ($P < 0,05$) coeficientes de digestibilidade total (DT) em relação à testemunha para MS (62,8% vs 59,4%), FDN (58,6% vs 54,3%), CHT (65,1% vs 61,5%) e NDT (65,8 vs 62,3%) e o tratamento monensina foi semelhante à testemunha. Observou-se maiores coeficientes de digestibilidade intestinal (DI) para o tratamento LLOSC1 em relação a testemunha destacando-se a DI da PB (63,3% vs 52,6%) e DI dos CNE (45,3% vs -26,98%). Houve efeito ($P < 0,05$) de horário de coleta após a alimentação sobre pH, N-NH₃ e AGV. Para o tratamento LLOSB3 verificou-se menor valor de pH (6,48) e maiores produções acetato (52,58 μ M/mL) de butirato (7,94 μ M/mL). A taxa de passagem de líquido não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos, entretanto maior volume ruminal foi verificado com adição de aditivos. A adição de própolis (LLOSC1) foi efetiva em aumentar a energia digestível para bubalinos alimentados com dietas à base de forragem.

Palavras-chave: ácidos graxos voláteis, consumo, digestibilidade, nitrogênio amoniacal, pH ruminal

Digestibility and ruminal parameters of diet based in roughage with the addition of propolis and monensin sodium for buffalo

Abstract: The objective was to study the effect of the administration of products containing propolis LLOSB3 and LLOSC1 in two propolis concentrations (B and C) and two different alcoholic extractions (1 and 3) and monensin sodium on intake, total and partial digestibility, and ruminal characteristics in buffaloes fed diet based on roughage. It was used four castrated Murrah buffalo with average weight of 459.3 ± 44.5 kg in experimental design Latin square 4×4 (4 treatments: control, monensin, LLOSC1 and LLOSB3 and four periods). The diet had 80% of roughage (corn silage and Tifton's hay) and 20% concentrate, with 11.1% CP and 66% of NDT. The intake of DM and other evaluated nutrients did not differ ($P > 0.05$) between treatments. The addition of LLOSC1 provided higher ($P < 0.05$) total digestibility (TD) coefficients in relation to the control for DM (62.8% vs 59.4%), NDF (58.6% vs 54.3%), CHT (65.1% vs 61.5%) and TDN (65.8 vs. 62.3%), and monensin treatment was similar to the control. There was a higher coefficient of intestinal digestibility (ID) for the treatment LLOSC1 in relation to control highlighting the ID of CP (63.3% vs 52.6%) and ID of the NSC (45.3% vs 26, 98%). There was effect ($P < 0.05$) of time collection after feeding on pH, $\text{NH}_3\text{-N}$ and VFA. For treatment LLOSB3 there was less pH value (6.48) and highest productions of acetate (52.58 $\mu\text{M}/\text{mL}$) and butyrate (7.94 $\mu\text{M}/\text{mL}$). The passage rate of liquid did not differ ($P > 0.05$) between treatments, however was found with the addition of additives. The addition of propolis (LLOSC1) was effective in increasing the digestible energy for buffalo fed with roughage based diets.

Key-words: ammonia nitrogen, digestibility, intake, pH, volatile fatty acids

Introdução

A criação de búfalos tem crescido em termos produtivos e em mercado consumidor e o Brasil destaca-se como o maior criador de búfalos do Ocidente com três milhões e meio de cabeças e com crescimento anual de 3,0% na média nacional, segundo Associação Brasileira de Criadores de Búfalos (Bernardes, 2007).

O leite e carne dos bubalinos possuem atributos peculiares que podem superar aos dos bovinos, como a produção de mozzarella do leite de búfala com maior percentual de proteínas, gorduras, cinzas, cálcio e fósforo e de sabor mais adocicado (Amaral, *et al.* 2005) e a carne apresenta maciez e suculência além de baixos teores de gordura total e composição de ácidos graxos de menor aterogenicidade e trombogenicidade (Lira *et al.*, 2005)

Os sistemas de produção extensivo e semi-extensivo são a base da criação bubalina sendo a forragem seu principal alimento. O menor aproveitamento energético proporcionado pelo padrão de fermentação ruminal da forragem acarreta em produção metano que é prejudicial ao planeta contribuindo para o aquecimento global (Johnson & Johnson, 1995).

Os efeitos benéficos dos ionóforos em dietas concentradas foram demonstrados em inúmeras pesquisas (Nagajara *et al.*, 1997; Sales & Lucci, 2000). Porém seu uso tem demonstrado aumento no ganho de peso de animais a pasto, provavelmente pela melhoria na produção de propionato e diminuição na metanogênese que parece compensar a perda na digestibilidade na fibra, permitindo maior valor de energia metabolizável (Potter *et al.* 1976; Lana & Russell, 2001).

A própolis tem sido estudada como aditivo alimentar natural em ruminantes, devido ao seu poder bactericida e bacteriostático. Trabalhos utilizando própolis na alimentação de ruminantes apresentaram resultados positivos (Stradiotti *et al.*, 2004; Pontara *et al.*, 2007). Foi verificado por Prado (2005) aumento em 10 unidades percentuais utilizando o produto LLOB3 e de 6,4 unidades percentuais com o aditivo LLOC1, em relação a monensina sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca em dietas com 100% de volumoso.

Assim, objetivou-se estudar o efeito dos produtos LLOB3 e LLOC1 em duas extrações alcoólicas (1 e 3) e duas concentrações de própolis (B e C) e da monensina sódica em dieta à base de forragem sobre o consumo, digestibilidade total e parcial e características ruminais em bubalinos.

Material e métodos

O experimento foi realizado no setor de Bovinocultura de Corte da Fazenda Experimental de Iguatemi, no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal e no Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Foram utilizados quatro búfalos Murrah castrados, com peso corporal inicial de $459,3 \pm 44,5$ kg. Os animais foram fistulados no rúmen e mantidos em baias individuais cobertas, com piso de concreto, providas de comedouro e bebedouro.

Os animais foram alimentados com uma dieta com razão volumoso:concentrado de 80:20% e foram balanceadas para conter 66% de NDT e 11% de proteína bruta. A composição bromatológica e percentual dos alimentos e da ração total constam na Tabela 1. Os tratamentos experimentais diferiram somente para a inclusão ou não dos aditivos sendo denominados: testemunha (sem aditivo), monensina sódica, LLOSC1, LLOSB3.

Tabela 1 – Composição bromatológica e percentual dos alimentos e dieta experimental.

Alimentos	Composição (% MS)								% na dieta
	MS	MO	PB	EE	FDN	FDA	CHT	CNE	
Silagem de milho	34,5	95,2	7,5	2,4	60,2	36,7	85,3	25,1	60,0
Feno de tifton	94,0	95,4	5,2	0,8	82,8	42,2	89,5	6,7	20,0
Farelo de soja	91,7	93,6	50,4	2,1	10,7	10,3	41,1	30,5	4,45
Milho moído	90,6	98,8	8,8	3,1	15,4	4,0	86,9	71,4	12,73
Uréia	99,0	-	312,1	-	-	-	-	-	0,72
Óleo de soja	99,0	-	-	99,9	-	-	-	-	1,1
Sal mineral ¹	99,0	-	-	-	-	-	-	-	1,0
Dieta total (80:20) ²	57,9	92,9	11,1	3,2	55,1	31,4	82,0	26,9	100

¹Composição por kilo de sal mineral: 65,0 g de fósforo; 130,0 g de cálcio; 5,0 g de magnésio; 13,0 g de enxofre; 700 mg de ferro, 850 mg de cobre; 1000 mg de manganês, 120 mg de iodo e 80 mg de cobalto

²Relação volumoso:concentrado

Os produtos contendo própolis (LLOSC1 e LLOSB3) foram preparados de acordo com a metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999) em duas extrações alcoólicas (1 e 3) e duas concentrações de própolis (B e C), os quais estão patenteados com patrimônio intelectual sob o nº PI 0605768-3 e os teores de flavonóides totais em crisina, quantificados por Prado (2005) são de 0,018 mg/g de produto LLOSC1 e de 0,0011 mg/ g de produto LLOSB3. Esses produtos foram selecionados a partir dos estudos *in vitro* realizados anteriormente e que apresentaram maior valor de DIVMS em dietas com 100% de feno de tifton (Prado, 2005).

Para o fornecimento de monensina sódica foi utilizado o produto comercial Rumensin® que contém 10% do princípio ativo e a dose fornecida, de acordo com o

fabricante, foi de 2 g do produto/animal/dia. As doses dos produtos contendo própolis (LLOS) foram calculadas de maneira que as concentrações de própolis avaliadas estivessem contidas também em 2 g de produto LLOS/animal/dia.

Todos os aditivos foram pesados em separado, embalados em papel higroscópico o qual continha 1g do aditivo. Os aditivos foram colocados diretamente no rúmen do animal através da cânula ruminal, no momento da alimentação matutina (8 h) e da vespertina (16 h) assegurando dessa forma o fornecimento da dose diária de 2 g de aditivo.

Cada período experimental foi de 21 dias (ao todo quatro períodos), sendo 14 dias para adaptação dos animais aos tratamentos e sete dias de coleta. Do primeiro ao quarto dia do período de coleta, foram amostrados, cerca de 400 mL de digesta omasal/dia, obtida por sucção do conteúdo omasal, por meio do orifício retículo-omasal, segundo técnica descrita por Leão *et al.* (2002). No primeiro dia foi realizada a coleta às 8 h, no segundo dia às 12 h, no terceiro dia às 16 h e no quarto dia às 20 h (perfazendo um total de quatro amostras por animal em cada período). Os dois últimos dias de coleta foram utilizados para a coleta de líquido ruminal e conteúdo ruminal para avaliar as características da fermentação. Os animais foram pesados no final de cada período de adaptação e de coleta para estimar o consumo de MS e de nutrientes em relação ao peso corporal (PC) dos animais.

Para determinação do pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos voláteis (AGV) o fluido ruminal foi coletado no quinto dia do período de coleta, via cânula ruminal, nos tempos zero, 2, 4, 6 e 8 horas após a alimentação da manhã. O pH foi determinado imediatamente após a coleta. Aproximadamente 50 mL foram acidificados com 1 mL de ácido sulfúrico 1:1 para posteriores determinações das concentrações de N-NH₃ e AGV.

Foi administrado no rúmen dos animais 30 g de Co-EDTA diluídos em 500 mL de água destilada antes da primeira alimentação e infundido em dose única para a determinação da taxa de passagem de líquidos (Uden *et al.*, 1980). Foram coletados cerca de 50 mL de líquido ruminal antes da infusão e a cada duas horas até completar 12 h e uma última coleta às 24 h após a administração do marcador.

No último dia de coleta de cada período, foram amostrados cerca de 1,5 kg de conteúdo ruminal (2 h após a alimentação), misturados a 500 mL de solução salina 0,9% (NaCl), homogeneizados em liquidificador, coados em tecido duplo e o filtrado armazenado a -20°C para ser processado de acordo com metodologia de Cecava *et al.*

(1990). Para a determinação do fluxo omasal de proteína microbiana, foram utilizadas bases purinas, quantificadas conforme técnica descrita por Ushida *et al* (1985). O fluxo total de N microbiano para o duodeno (g/dia) foi estimado pela divisão da razão N:purina bactéria pela razão N:purinas digesta duodenal e multiplicando esse quociente pelo fluxo total individual de N. A eficiência de síntese microbiana foi também expressa em g de N microbiano/ kg de MO verdadeira degradada no rúmen (MOVDR).

Durante o período experimental, foram feitas pesagens diárias do alimento fornecido e das sobras que foram amostrados e armazenados. Todas as amostras de líquido e conteúdo ruminal foram armazenadas separadas em embalagens plásticas específicas, as quais foram previamente etiquetadas e congeladas a -20°C para posteriores análises químicas.

Para determinação dos fluxos diários de matéria seca (MS) no rúmen, intestino e nas fezes foi utilizado o óxido crômico (Cr_2O_3) como indicador externo. Foram fornecidas duas doses intra-ruminais diariamente (8 h e 16 h) de cinco gramas de óxido crômico, previamente, pesado e acondicionado em papel higroscópico, perfazendo um total de 10 g de Cr_2O_3 /dia. As concentrações de óxido de cromo nas amostras de digesta omasal e fezes foram determinadas por meio de espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nitro-perclórica (Kimura & Miller, 1957).

A dosagem de amônia nas amostras de líquido ruminal foi realizada pela técnica de Ferner (1965) modificada por Vieira (1980). O líquido de rúmen foi analisado para ácidos graxos voláteis pela metodologia descrita por Bock *et al.* (1991).

Os teores de MS, MO, PB e EE foram determinados segundo AOAC (1980) citados em Silva & Queiroz (2002). As determinações de fibra em detergente neutro (FDN) e da fibra em detergente ácido (FDA) foram conduzidas de acordo com Van Soest *et al.* (1991).

Para a quantificação dos carboidratos totais (CHT) e não estruturais (CNE), utilizaram-se às equações descritas por Sniffen *et al.* (1992): $\text{CHT} = 100 - (\% \text{PB} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas})$ e $\text{CNE}\% = 100 - (\% \text{PB} + \% \text{FDN} + \% \text{EE} + \% \text{Cinzas})$. Os valores de NDT observados foram calculados para as diferentes dietas pela equação: $\text{NDT} = \text{PBD} + \text{EED} * 2,25 + \text{CHTD}$, em que PBD = proteína bruta digestível, EED = extrato etéreo digestível e CHTD = Carboidratos totais digestíveis.

Os coeficientes de digestibilidade totais e parciais da MS e demais nutrientes foram calculados de acordo com as fórmulas descritas por Coelho da Silva e Leão (1979).

A taxa de passagem de líquido e as curvas de concentração ruminal do Co foram ajustadas ao modelo exponencial unicompartimental de Hungate (1966), citado por Colucci (1984): $Y_{Co} = A \times e^{(-k_1 \cdot t)}$ em que Y_{Co} = concentração do indicador no tempo t ; A = concentração de equilíbrio do Co; k_1 = taxa de passagem ou de diluição do Co; e t = tempo de amostragem. Os parâmetros da dinâmica da fase líquida foram calculados de acordo com Colucci et al. (1990): Tempo de retenção no rúmen (h) = 1/ taxa de passagem de fluidos (%/h); Volume de líquido ruminal (L) = quantidade de Co fornecida (mg) / A ; Taxa de fluxo ruminal (L/h) = $k_{1Co} \times VLR$; Taxa de reciclagem da fase líquida ruminal (nº de vezes/dia) = 24 h/TeR (calculada conforme Maeng & Baldwin, 1976).

Os dados foram analisados em delineamento experimental com quadrado latino 4 X 4 (quatro animais, quatro períodos e quatro tratamentos). As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas no (SAS) Sistema de Análises por meio de análise de variância no procedimento PROC GLM.

Para os valores de pH, N-NH₃ e AGV no líquido ruminal, procederam-se à subdivisão de parcelas experimentais em função dos tempos de amostragem. Foi utilizada a análise de regressão para as concentrações de pH, N-NH₃ e AGV do líquido ruminal em função do tempo após a alimentação da manhã (zero, 2, 4, 6, 8 horas) para cada tratamento e o efeito de hora foi desdobrado em polinômio ortogonal. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey considerando 5% o grau de significância e até 10% de probabilidade como tendência.

Resultados e discussão

Não houve diferença ($P > 0,05$) de consumo de matéria seca (MS) e nutrientes para os tratamentos experimentais com valores médios de MS, PB, FDN e NDT de 1,91; 0,21; 1,05 e 1,21% do peso corporal (PC), respectivamente (Tabela 2).

Os consumos de MS, MO e PB observados estão em acordo aos reportados por Beleze (2005) para búfalos alimentados com dietas contendo 11% de PB em dieta total de 80:20% de volumoso:concentrado, de 1,98% PC para MS; 1,81% PC para MO e 0,20% PC para PB. Os consumos de FDN e FDA observados foram inferiores aos reportados por Beleze (2005) de 1,32% PC para FDN e 0,66% PC para FDA (Tabela 1).

A influência da monensina no consumo foi avaliada em bovinos por Oliveira *et al.* (2005) que observaram redução expressiva do consumo de MS de 2,65 kg/animal/dia em dietas com baixo teor de proteína e redução de 1,22 kg/animal/dia para alto teor de proteína. O efeito de monensina sódica e levedura em dieta volumosa em bovinos e

bubalinos também foi estudado por Beleze (2005) e observou diminuição no consumo de MS de 0,15 kg/dia em relação à testemunha para tratamentos contendo monensina sódica, inferior a redução de 0,30 kg/dia observada no presente estudo (Tabela 2).

Tabela 2 – Média, probabilidade (P), e coeficiente de variação (CV) para os consumos de nutrientes de bubalinos alimentados com dieta volumosa e aditivos contendo própolis (LLOS¹) e monensina sódica

		Tratamento				P	CV
		Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
MS	kg/dia	10,0	9,7	9,7	10,0	0,663	4,174
	g/PM	92,2	90,0	89,6	91,6	0,731	4,193
	% PC	1,9	1,9	1,9	1,9	0,736	4,303
MO	kg/dia	9,3	9,0	9,0	9,3	0,666	4,261
	% PC	1,8	1,8	1,8	1,8	0,738	4,403
PB	kg/dia	1,1	1,1	1,1	1,1	0,772	3,524
	% PC	0,2	0,2	0,2	0,2	0,617	2,709
EE	kg/dia	0,3	0,3	0,3	0,3	0,815	5,704
	% PC	0,1	0,1	0,1	0,1	0,528	4,072
FDN	kg/dia	5,6	5,4	5,4	5,5	0,676	5,013
	% PC	1,1	1,1	1,0	1,1	0,737	5,462
FDA	kg/dia	2,2	2,1	2,1	2,0	0,662	7,193
	% PC	0,4	0,4	0,4	0,4	0,569	7,918
CHT	kg/dia	8,2	8,0	7,9	8,2	0,642	4,3835
	% PC	1,6	1,55	1,54	1,58	0,747	4,6654
CNE	kg/dia	2,66	2,6	2,6	2,7	0,510	3,4190
	% PC	0,5	0,5	0,5	0,5	0,701	3,4147
NDT	Kg/dia	6,23	6,09	6,39	6,37	0,4744	4,5402
	% PC	1,21	1,18	1,24	1,22	0,6154	4,6539

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%
¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

Houve diferença ($P < 0,05$) para a digestibilidade total (DT) da MS e dos nutrientes (Tabela 3). O tratamento LLOSC1 destacou-se por apresentar os maiores coeficientes de DT ($P < 0,05$) em todos os nutrientes estudados, exceto sobre a PB e CNE a qual foi semelhante ($P > 0,05$) para todos os tratamentos.

O tratamento contendo própolis, LLOSC1, propiciou maior ($P < 0,05$) coeficiente de DT da MS e da MO que foi superior a adição de monensina e tratamento testemunha que não diferiram entre si. A adição de produto LLOSB3 não diferiu de nenhum dos tratamentos testados. A maior DT da MS propiciada pela adição de LLOSC1 ($P < 0,05$) concorda com resultados obtidos por Prado (2005) que avaliou LLOSC1 adicionado em dieta à base de feno sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e

observou maior valor de 45,5% em relação a adição de monensina e testemunha, que não diferiram entre si, com valor médio de 39,1%.

Entretanto, em trabalho concomitante, a DT da MS e nutrientes para o aditivo LLOSC1, em bovinos em crescimento recebendo dieta volumosa, foi menor em relação ao tratamento monensina (Prado 2008). A diferença entre resultados pode ser atribuída à diferença na composição da microbiota ruminal entre bubalinos e bovinos, pois os búfalos apresentam maior quantidade de bactérias celulolíticas e diferente população de protozoários (Franzolin & Franzolin, 2000). Outras variáveis podem ter influenciado os comportamentos registrados para as espécies estudadas, pois os bovinos utilizados estavam em fase de crescimento (peso médio de 220 kg) e alimentados com dietas de maior teor de PB e energia que a dos bubalinos, que já estavam atingindo o peso adulto.

A DT da MS do tratamento monensina não diferiu da testemunha para búfalos, o que diverge dos dados encontrados por Lana *et al.* (2001) que testaram a susceptibilidade de células bacterianas a monensina provenientes de dieta volumosa e consideraram que em estudos de desempenho de bovinos com dietas volumosas a monensina poderia ter maior efeito. Porém, os resultados aqui encontrados concordam com Beleze (2005) que forneceu a búfalos tratamentos dieta volumosa contendo monensina e levedura e não encontrou diferenças para as DT da MS dos tratamentos testemunha e monensina.

Não houve efeito dos tratamentos ($P>0,05$) para a DT da PB. Oliveira *et al.* (2004) avaliaram o efeito da monensina e própolis sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta e observaram que a monensina reduziu a degradação da tripticase e do farelo de soja pela inibição da produção de amônia; e a própolis aumentou a degradação da farinha de peixe, pelo aumento da concentração de proteína solúvel no meio. Assim era esperado que a monensina aumentasse a quantidade de proteínas para ser digerida na porção do intestino delgado, conseqüentemente, melhorando a DT da PB.

A percentagem de PB da ração experimental foi de 11,1%, dos quais 20,27% do total de PB da dieta total foi composta de nitrogênio não-protéico o qual pode ter prejudicado a ação do tratamento monensina, pois este aditivo inibe a degradação da proteína verdadeira (Van Soest & Demeyer, 1977).

Os tratamentos contendo LLOSC1 e monensina apresentaram maiores coeficientes de DT do EE ($P<0,05$) em relação ao produto LLOSB3 e o tratamento testemunha não diferiu dos tratamentos experimentais. Da mesma forma Lana *et al.*

(2005) observaram que a DT do EE do tratamento contendo própolis, fornecido a cabras, que não diferiu do tratamento controle. É provável que a redução na DT do EE observado com o LLOS3 foi devida às substâncias presentes nesse produto, que podem ter prejudicado a ação das bactérias lipolíticas.

Tabela 3 – Média, probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) para os coeficientes de digestibilidade aparente total e parcial em bubalinos alimentados com dieta volumosa e diferentes aditivos contendo monensina e própolis (LLOS³)

	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOS3		
Digestibilidade total (DT)						
MS (%)	59,4b	59,5b	62,8a	60,8ab	0,0077	1,5753
MO (%)	60,0b	60,1b	63,6a	61,6ab	0,0031	1,4110
PB (%)	55,9	57,5	59,6	57,3	0,2302	3,8471
EE (%)	79,8ab	80,5a	80,7a	75,4b	0,0332	2,6041
FDN (%)	54,3b	54,6b	58,6a	55,5ab	0,0260	2,7424
FDA (%)	34,0b	33,7b	38,4a	30,2c	0,0010	4,1303
CHT (%)	61,5b	61,5b	65,1a	63,3ab	0,0081	1,7029
CNE (%)	76,5	75,8	78,5	79,1	0,5059	4,4145
NDT	62,31b	62,54b	65,78a	63,65ab	0,0117	1,6472
Digestibilidade ruminal (DR)						
MS ¹ (%)	41,6a	27,4c	27,0c	31,8b	0,0001	3,5245
MS ² (%)	70,1a	46,1c	43,2c	52,4b	0,0001	3,6079
MO ² (%)	85,8a	65,2b	58,5c	70,8b	0,0001	3,4433
PB ¹ (%)	6,8a	-6,9b	-10,1c	-6,9b	0,0001	13,7323
PB ² (%)	12,3a	-12,0b	-17,0c	-12,0b	0,0001	11,1299
FDN ¹ (%)	49,3a	35,0c	38,1c	44,5b	0,0001	3,5932
FDN ² (%)	90,7a	64,1c	65,1c	80,3b	0,0001	3,9915
FDA ² (%)	72,3a	49,4b	39,3c	46,6b	0,0001	3,2259
CHT ² (%)	96,8a	76,5bc	69,9c	81,9b	0,0001	3,4707
CNE ¹ (%)	80,7a	71,3b	60,3c	66,7bc	0,0013	5,2954
CNE ² (%)	105,8a	94,5ab	77,0c	84,2bc	0,0028	6,9160
Digestibilidade intestinal (DI)						
MS ¹ (%)	30,4c	44,2b	48,9a	42,5b	0,0001	4,5710
MS ² (%)	29,9c	53,9a	56,8a	47,6b	0,0001	4,0573
MO ² (%)	14,2c	34,8b	41,5a	29,2b	0,0001	8,0659
PB ¹ (%)	52,6b	60,2a	63,3a	60,0a	0,0006	2,8711
PB ² (%)	87,7c	112,0b	117,0a	112,0b	0,0001	0,7454
FDN ¹ (%)	9,9c	30,1a	33,0a	19,8b	0,0001	10,7964
FDN ² (%)	9,3c	35,8a	34,9a	19,7b	0,0001	12,01581
FDA ² (%)	27,7c	50,6b	60,7a	53,4b	0,0001	3,4764
CHT ² (%)	3,2c	23,5ab	30,0a	18,0b	0,0001	15,0821
CNE ¹ (%)	-26,98b	14,0ab	45,3a	36,9a	0,0157	131,2761
CNE ² (%)	-5,8c	5,4bc	22,9a	15,7ab	0,0028	65,1257

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. ¹ porcentagem do que chega ao compartimento. ² porcentagem do total digerido. ³ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOS3

O produto LLOSC1 aumentou ($P<0,05$) a DT da FDN e FDA em relação à adição de monensina e tratamento testemunha. Para o tratamento LLOSB3 a DT da FDN não diferiu dos demais tratamentos e para DT da FDA foi inferior ($P<0,05$) aos demais (Tabela 3).

Com relação aos CHT verificou-se que quando se adicionou LLOSC1 em relação a monensina e testemunha, o maior efeito foi na porção fibrosa da dieta. Pois tanto a DT dos CHT, da FDN e da FDA foram superiores com adição de LLOSC1, uma vez não houve efeito ($P>0,05$) da adição de LLOSC1 para a fração de carboidratos presentes no conteúdo celular (CNE).

O produto LLOSC1 pode estar selecionando bactérias que degradam a celulose e celobiose, cuja maior atividade implique em melhora na digestibilidade da FDN, FDA e conseqüentemente na dos CHT. Estudos *in vitro* (Prado, 2008) indicaram que o aditivo LLOSC1 seleciona bactérias ruminais capazes de degradar todos os substratos testados como a celulose, celobiose, arabinose, xilose, frutose, lactose e glicose.

Em conseqüência das diferenças obtidas especialmente em relação a DT dos CHT, os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) diferiram em relação aos tratamentos testados, seguindo o mesmo comportamento da DT dos CHT, com maior valor ($P<0,05$) para o tratamento LLOSC1 em relação aos tratamentos testemunha e monensina. O tratamento LLOSB3 não diferiu dos demais aditivos testados.

Houve efeito ($P<0,05$) dos tratamentos sobre a digestibilidade ruminal (DR) da MS e dos nutrientes (Tabela 3). Do total digerido no trato gastrointestinal a testemunha propiciou maior DR ($P<0,05$) em relação aos demais tratamentos. A DR da MO apresentou comportamento semelhante a MS, uma vez que a DR da MO para a testemunha (85,80%) foi superior aos demais tratamentos. O produto LLOSB3 (70,80%) e monensina (65,2%) não diferiram entre si e foram superiores a LLOSC1 (58,53%).

Os menores valores de DR para os tratamentos contendo aditivos são um indicativo de alterações na microbiota ruminal, visto que a diferença entre tratamentos foi a inclusão dos aditivos alimentares. Atuações diferenciadas sobre as populações de microrganismos foram observadas, destacando-se o LLOSB3 que influenciou menos negativamente sobre a fermentação ruminal da MS, MO, PB e fração fibrosa da dieta.

De forma geral, os bubalinos têm maior população de bactérias e fungos (Tewatia & Bhatia, 1998) o que permite degradar mais eficientemente a parede celular das forragens e a proteína da dieta, que confere aos bubalinos maior capacidade de

transformar forragens de baixa qualidade em energia disponível na forma de ácidos graxos voláteis. A maior população de fungos e bactérias pode explicar o maior coeficiente de DR da MS para o tratamento testemunha, visto que, além dos aditivos atuarem sobre as bactérias do rúmen, podem estar atuando sobre a população de fungos e protozoários, os quais possuem ação celulolítica. Não se sabe o espectro de ação da própolis sobre a população de fungos ruminais. Todavia, a própolis reduziu o número de protozoários ruminais em experimento *in vitro* (Broudiscou *et al.*, 2000).

O tratamento contendo LLOSB3 teve menor efeito sobre a DR da MS, MO, FDN, FDA e CHT ($P < 0,05$) em relação a LLOSC1. Isto pode ser atribuído a ação diferenciada dos produtos LLOS sobre as bactérias ruminais, que também foi observado por (Prado, 2005) que analisou a DIVMS de dietas volumosas com a adição de LLOSB3 (49,09%), o qual apresentou maior valor que LLOSC1 (45,49%).

Da mesma forma, em experimento *in vitro* em que se avaliou tolerância de bactérias ruminais aos produtos contendo própolis, Prado (2008) observou que as bactérias tolerantes aos produtos LLOSB3 e LLOSC1 em dietas com 100% de volumoso apresentaram características de especificidade diferenciada aos substratos testados. As bactérias tolerantes ao LLOSB3 foram mais especializadas e apresentaram preferências por nichos de fermentação, enquanto as bactérias tolerantes a LLOSC1 apresentaram comportamento generalista, ou seja, degradaram todos os substratos testados. Assim, no ambiente ruminal onde foi adicionado LLOSB3 pode estar selecionando bactérias celulolíticas específicas e bactérias fermentadoras de açúcares solúveis, o que resultou em menor redução da DR da MS e da fração fibrosa propiciando maiores coeficientes de DR da MS, FDN, FDA e CHT em relação a LLOSC1. Esse fato foi confirmado pela maior produção de AGV no líquido ruminal quando o produto LLOSB3 foi adicionado à dieta (Tabela 4). Quando a bactéria não possuiu especificidade por celulose, como no exemplo das bactérias tolerantes a LLOSC1, essa degradação pode ocorrer mais lentamente e ocasionar a diminuição da DR da MS e da FDN.

Os tratamentos contendo monensina e LLOSC1 apresentaram maior redução dos coeficientes de DR da MS e nutrientes. A monensina atua sobre as bactérias Gram-positivas, reduzindo a população de bactérias celulolíticas (Oehem & Pickrell, 1999). Desta maneira, em dieta volumosa a DR da MS foi afetada, pois a maior parte da MS tem origem na porção fibrosa da dieta.

Ainda não está esclarecido o mecanismo de ação da própolis sobre as bactérias ruminais, mas estudos mostraram que esta age diretamente na duplicação da RNA-polimerase atuante sobre o processo de replicação celular (Takaisi-Kikuni & Schilcher, 1994). O ionóforo monensina atua sobre a membrana plasmática celular, fazendo com que íons K entrem provocando lise por diferença osmótica (Russell & Strobel, 1989). Entretanto, os resultados da DR da MS foram semelhantes ($P > 0,05$) para os tratamentos com adição de LLOSC1 (43,2%) e monensina (46,1%).

Quanto a digestão da PB é desejável que a maior parte aconteça na fração intestinal. Sabendo que não há absorção de aminoácidos pelas papilas ruminais, os coeficientes de digestibilidade registrados neste compartimento são perdas protéicas na forma de amônia.

Houve diferença ($P < 0,05$) entre os tratamentos para a DR da PB (% do que chega ao compartimento), ocorreram menores perdas de nitrogênio para o tratamento LLOSC1 seguido pelos tratamentos LLOSB3 e monensina e a maior perda de PB na forma de amônia foi para o tratamento testemunha. Os aditivos LLOSC1, LLOSB3 e monensina podem estar agindo tanto no aumento da atividade celulolítica quanto no direcionamento do esqueleto carbonado para a síntese microbiana juntamente com o nitrogênio não-protéico, ocasionando, desta forma, possível maior síntese microbiana.

Para a digestão de CNE, é preferível que a maior parte aconteça na fração intestinal, pois melhora o aproveitamento energético da dieta, assim, o aditivo LLOSC1 destacou-se por apresentar menor DR ($P < 0,05$) em relação aos tratamentos testemunha e monensina.

Houve diferença para a digestibilidade intestinal (DI) da MS, sendo que o aditivo LLOSC1, apresentou maior coeficiente (56,8%) seguido da monensina (53,9%) que foram semelhantes e superiores ao tratamento LLOSB3 (47,6%) que por sua vez foi superior ao tratamento testemunha (29,89%). A DI da MO apresentou o mesmo comportamento da MS, destacando-se o tratamento LLOSC1 ($P < 0,05$) em relação aos demais (Tabela 3).

Para os valores de DI da MS e demais nutrientes dos tratamentos contendo aditivo, foi observado que houve alterações no principal local de digestão (rúmen) em relação ao tratamento testemunha, com aumentos significativos na digestibilidade intestinal. Este fato pareceu mais evidente no tratamento LLOSC1 e a provável mudança de comportamento ocorreu porque diminuiu a digestão no rúmen e conseqüentemente aumentou a quantidade de nutrientes que chega ao intestino e que foi

digerida neste compartimento. Outra hipótese é que a ação dos produtos contendo própolis poderia ter efeito sobre bactérias intestinais selecionando-as.

Em consequência, do comportamento observado na fermentação ruminal da proteína para dieta com aditivos, o maior coeficiente de DI de PB ($P < 0,05$) foi para o tratamento LLOSC1, seguido dos tratamentos contendo LLOSB3 e monensina e superiores a testemunha. O aumento na digestibilidade intestinal da proteína é benéfico, uma vez que aumenta a disponibilidade de aminoácidos para ser utilizados pelas vísceras drenadas pelo sistema porta, esplênico e tecidos. Este mesmo comportamento foi observado para os CNE, onde LLOSC1 apresentou juntamente com LLOSB3 os maiores valores de DI de 45,3% e 36,9% (% do que chega no compartimento), respectivamente. Esses maiores valores de digestibilidade indicaram possível melhor absorção dos carboidratos solúveis pelo intestino delgado e melhor aproveitamento de energia, visto que a molécula de glicose absorvida na fração intestinal provê 42% mais energia do que a degradada no rúmen (Owens *et al.*, 1986).

Para os coeficientes de DI da FDN destacaram-se dois tratamentos superiores aos demais, são eles monensina e LLOSC1. Nota-se que há uma diminuição da digestão ruminal da FDN e aumento da DI (intestino grosso) para os tratamentos contendo aditivos em relação ao tratamento testemunha, em especial para LLOSC1 e monensina. Essa alteração quanto ao principal local de fermentação da fração fibrosa (rúmen) não teve prejuízo na digestibilidade da fibra, pois a DT da FDN foi superior ($P < 0,05$) para LLOSC1 e não diferiu entre os demais tratamentos.

Para a DI de CHT também o tratamento LLOSC1 foi superior ($P < 0,05$) em relação aos tratamentos LLOSB3 e testemunha, não diferindo, porém da monensina, já para a DI da FDA o tratamento LLOSC1 apresentou-se valor superior aos demais tratamentos testados ($P < 0,05$). Assim, como já foi citado para outros nutrientes, nota-se uma melhora na eficiência na digestão intestinal dos aditivos em especial do LLOSC1 e monensina.

Não houve efeito ($P > 0,05$) da interação tratamento x horário de coleta para valores de pH e concentrações de nitrogênio amoniacal. Porém, houve efeito ($P < 0,05$) de horário de coleta para pH e nitrogênio amoniacal (Figura 1).

O valor de pH ruminal mínimo observado foi de 6,42 as 4,7 h após a alimentação. O menor valor de pH foi para o tratamento LLOSB3 (6,48; $P < 0,05$) em relação aos tratamentos testemunha e monensina (Tabela 4) e este ainda ficou acima de 6,2 considerados mínimo para crescimento das bactérias celulolíticas (Russell &

Dombrowski,1980). Os altos valores de pH ruminal foram propiciados pela dieta volumosa e pela espécie bubalina que apresenta valores de pH ruminal elevados em decorrência da maior secreção salivar e poder tampão da saliva (Sivkova *et al.*, 1997).

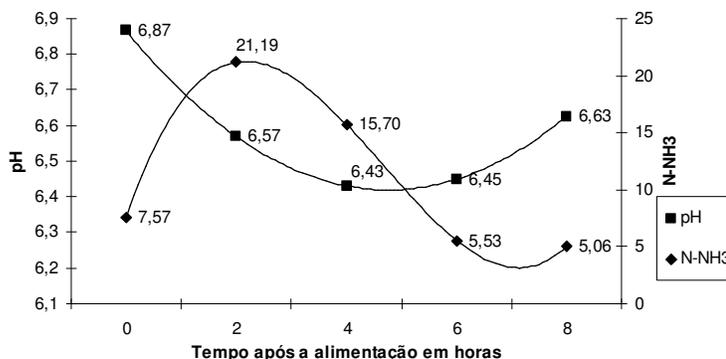


Figura 1 – pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) mg/100 mL do líquido ruminal em função do tempo após a alimentação para búfalos alimentados com dietas volumosas contendo diferentes aditivos $pH = 0,0197H^2 - 0,1874H + 6,8656 R^2=0,88$; $NH = 0,3H^3 - 4,1867H^2 + 13,98H + 7,5729 R^2=0,95$

O valor máximo da produção de nitrogênio amoniacal foi de 21,26 mg/100 mL as 2,18 h e a produção mínima de 3,15 mg/100 mL as 7,12 h, independente dos tratamentos experimentais (Figura 1). Apesar do menor valor estar abaixo de 5,0 mg/100 mL de líquido ruminal recomendado como nível mínimo para que ocorra fermentação (Satter & Styler, 1974) esse valor volta a níveis aceitáveis em 8 h após alimentação. Os bubalinos são mais eficientes no processo de reciclagem de nitrogênio e também na manutenção do balanço positivo de nitrogênio do que bovinos (Kurar & Mudgal, 1991; Trufchev *et al.*, 1997). Os tratamentos não influenciaram ($P>0,05$) nas concentrações de nitrogênio amoniacal (Tabela 4).

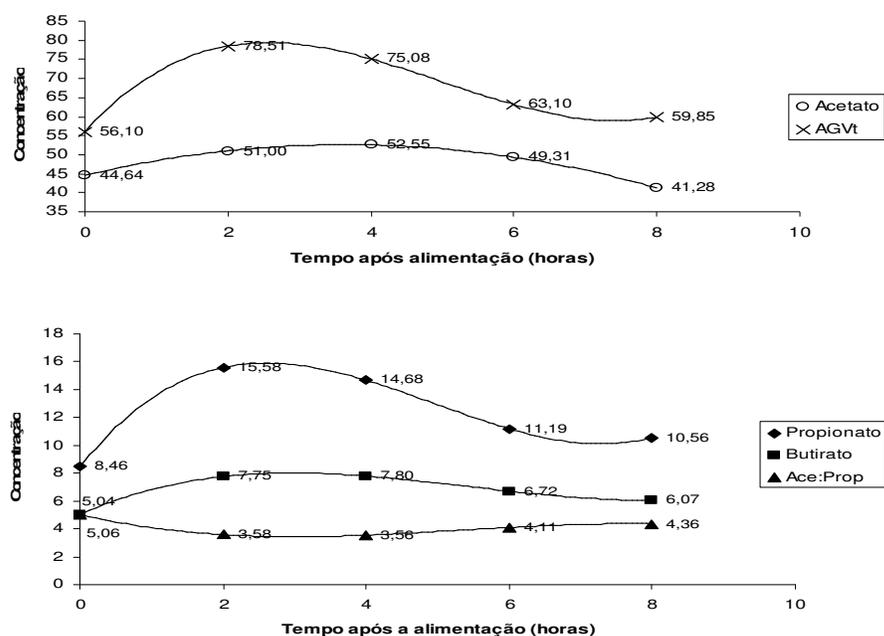
Tabela 4 – Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal e da produção de ácidos graxos voláteis para búfalos alimentados com dietas volumosas contendo ou não aditivos LLOS¹ e monensina

	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
pH	6,62a	6,67a	6,54ab	6,48b	0,0003	2,07
N-NH ₃ (mg/100 mL)	10,83	9,94	11,29	12,15	0,4627	41,10
AGV totais (μM/mL)	67,02	62,24	63,26	73,51	0,1629	27,27
Acetato (μM/mL)	48,26	44,82	45,39	52,58	0,0771	23,72
Propionato (μM/mL)	11,99	12,01	11,29	12,98	0,1249	23,42
Butirato (μM/mL)	6,77ab	5,42b	6,57ab	7,94a	0,0001	24,39
Ace:Prop	4,33	3,90	4,12	4,21	0,2138	13,26

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.[†] LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

Não houve interação ($P>0,05$) de tratamento x horário de coleta para a concentração de ácido acético, ácido propiônico, ácido butírico, AGV totais e razão acetato:propionato, porém houve efeito ($P<0,05$) de horário de coleta (Figura 2). Foi observado efeito cúbico ($P<0,05$) para todos os AGV estudados e razão acetato:propionato, exceto para acetato que apresentou comportamento quadrático ($P<0,05$).

Os valores máximos e mínimos para as concentrações de AGV totais foram de 79,41 $\mu\text{M}/\text{mL}$ as 2,57h e 58,88 $\mu\text{M}/\text{mL}$ as 7,41 h; para propionato de 15,91 $\mu\text{M}/\text{mL}$ as 2,61 h e 10,11 $\mu\text{M}/\text{mL}$ as 7,29 h; para butirato de 8,01 $\mu\text{M}/\text{mL}$ as 2,98 h e 6,06 $\mu\text{M}/\text{mL}$ as 7,92 h e para a razão acetato:propionato de 4,38 as 7,68 h e 3,44 as 2,98 h. Enquanto que, a concentração de acetato apresentou valor máximo de 52,63 $\mu\text{M}/\text{mL}$ as 3,65 h após a primeira alimentação (Figura 2).



$$\text{Ace} = -0,5995H^2 + 4,3757H + 44,643 \quad R^2 = 0,97; \text{AGVt} = 0,36H^3 - 5,3893H^2 + 20,543H + 56,101 \quad R^2 = 0,97; \text{Prop} = 0,1133H^3 - 1,6827H^2 + 6,4722H + 8,4623 \quad R^2 = 0,97; \text{But} = 0,0323H^3 - 0,5279H^2 + 2,2836H + 5,0406 \quad R^2 = 0,99; \text{Ace:Prop} = -0,01181H^3 + 0,2893H^2 - 1,2421H + 5,056 \quad R^2 = 0,96$$

Figura 2 – Concentração de ácidos graxos voláteis totais (AGVt); acetato (Ace); propionato (Prop); butirato (But) em $\mu\text{M}/\text{mL}$ do líquido ruminal e razão acetato:propionato (Ace:Prop) em função do tempo após a alimentação para búfalos alimentados com dietas volumosas contendo diferentes aditivos

Os valores percentuais relativos aos pontos máximos de AGV em relação à produção de AGV totais foram de 66,27% para acetato, 20,03% para propionato e 10,08% para butirato, o que concorda com dados obtidos por Beleze (2005) para

bubalinos alimentado com dieta volumosa e aditivos (monensina e levedura) que encontrou valores relativos aos AGV totais de 65,90% para acetato, 19,62% para propionato e 10,48% para butirato.

Os tratamentos influíram ($P < 0,05$) apenas na concentração de butirato (Tabela 4). O produto LLOSB3 propiciou maior ($P < 0,05$) concentração de butirato que a monensina e ambos não diferiram dos demais. O aditivo LLOSB3 ainda apresentou tendência ($P < 0,10$) de maior produção de acetato em relação a monensina e embora, sem diferença, a produção de AGV totais (73,51 $\mu\text{M/mL}$) de LLOSB3 foi superior em 11,27 unidades percentuais em relação a monensina (Tabela 4). Os resultados de LLOSB3 estão em acordo com os maiores valores de DR da FDN em relação a monensina e mostrou tendências de melhora nos parâmetros de fermentação ruminal.

O tratamento monensina propiciou a menor razão acetato:propionato (3,90), porém sem diferença ($P > 0,05$) entre os tratamentos, e LLOSC1 apresentou o segundo menor valor numérico (4,12). Esses resultados concordam com Lana *et al.* (2007) que trabalharam com cabras em dietas com níveis de óleo e própolis e encontraram evidências que a própolis pode diminuir a razão acetato:propionato.

Não houve efeito ($P > 0,05$) dos tratamentos sobre a taxa de passagem de líquido (11,5%/hora) provavelmente pela concentração de forragem, consumo e teor de FDN que foram semelhantes para os tratamentos (Tabela 1 e 2). A taxa de passagem de líquido é geralmente aumentada quando se eleva o nível de consumo e percentagem de forragem na dieta (Valadares Filho & Pina, 2006).

Tabela 5 - Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de taxa de passagem de líquido (TP, %/hora), tempo de retenção (TeR, horas), taxa de reciclagem (TRec, vezes/dia), taxa de fluxo líquido (TF, litros/hora) e volume ruminal (VR, litros e % do peso corporal) para dieta volumosa contendo ou não produto LLOS à base de própolis e monensina em bubalinos

Variável	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
TP (%/hora)	12,1	11,1	11,1	11,8	0,6072	10,9334
TeR (horas)	8,5	9,2	9,2	8,7	0,7615	12,5634
TRec (vezes/dia)	2,9	2,6	2,6	2,8	0,6072	10,9334
TF (L/hora)	8,1	7,4	8,0	8,6	0,3825	11,6053
VR (L)	67,8	73,9	71,8	72,9	0,0842	3,9080
VR (% PV)	13,1	14,3	14,0	14,0	0,0833	4,0755

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%

¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

Também não houve efeito dos aditivos ($P>0,05$) sobre o tempo de retenção (8,9 h), taxa de reciclagem (2,7 vezes/dia), taxa de fluxo (8,0 litros/hora) (Tabela 5). Esses valores foram próximos aos observados por Maeda (2007) para bubalinos alimentados com 60% de silagem de cana e nível de ingestão de MS de 1,46% de PC inferior ao observado, que foram para a taxa de passagem de líquido de 12,2%/hora, tempo de retenção de 8,6 h, taxa de reciclagem de 2,5 vezes/dia e volume ruminal de 16,5% do PC.

Entretanto, Prado (2008) avaliou aditivos contendo própolis em dieta volumosa para bovinos em crescimento e observou menor taxa de passagem de líquido de 8,0%/hora em relação aos observados para bubalinos de 11,5%/hora. Da mesma forma, o tempo médio de retenção para bubalinos (8,9 h) foi menor que a de bovinos (13,1 h). O menor tempo de retenção pode ser a mastigação mais eficiente e maior degradação fibrosa dos bubalinos (Singh *et al.* 1992).

Para tratamentos com aditivos houve tendência ($P<0,08$) de maior volume ruminal e numericamente menor taxa de passagem de líquido em relação ao tratamento testemunha, o que pode em parte ter influenciado os maiores valores de digestão ruminal dos nutrientes para o tratamento testemunha. Segundo Van Soest (1994) quando a taxa de diluição no rúmen é elevada melhora-se as condições para o crescimento dos microrganismos ruminais até certo ponto, entretanto se a taxa de diluição for rápida, provavelmente o crescimento microbiano reduzirá.

Não houve influência dos aditivos testados ($P>0,05$) sobre o teor de matéria orgânica (MO) e RNA de microrganismos ruminais (Tabela 6), cujos valores médios foram de 80,89% e 0,16 g/kg, respectivamente. O teor de MO microbiana observado (80,89%) foi superior ao obtido por Maeda (2007) que trabalhou com búfalos alimentados com dietas com 60% de silagem de cana (72,29%). Houve efeito de dietas sobre o teor de nitrogênio total dos microrganismos ruminais ($P<0,05$). Os tratamentos LLOSC1 e LLOSB3 obtiveram maiores valores em relação a monensina de 6,96% e 6,69% vs 5,77%, respectivamente, e o tratamento testemunha (6,26%) não diferiu de nenhum dos tratamentos testados. Para o teor de nitrogênio dos microrganismos ruminais em percentagem da MO, o tratamento LLOSC1 apresentou o maior teor (8,4%) em relação ao tratamento monensina (7,4%), os tratamentos LLOSB3 e testemunha não diferiram dos demais.

Os tratamentos LLOSC1 e monensina apresentaram maiores fluxos omasal de MO ($P<0,05$) em g/dia em relação ao tratamento testemunha de 5663,9 e 5493,6 vs

4507,1 respectivamente. O maior fluxo de MO de LLOSC1 e monensina está ligada ao aumento na eficiência de síntese microbiana (Tabela 6). Também, o fluxo de N total para o omaso para o tratamento testemunha foi menor ($P<0,05$) em relação aos demais, que não diferiram entre si.

Houve efeito dos tratamentos experimentais ($P<0,05$) sobre a matéria orgânica aparentemente degradável no rúmen (MOADR), porém não houve efeito ($P>0,05$) para matéria orgânica verdadeiramente degradável no rúmen (MOVDR). O tratamento testemunha apresentou o maior valor ($P<0,05$) de MOADR (4766,5 g/dia) em relação aos demais, seguido do tratamento LLOSB3 (4043,0 g/dia) e do tratamentos monensina (3523,0 g/dia) e LLOSC1 (3354,2 g/dia) sendo que os dois últimos não diferiram entre si. Para bovinos alimentados com dieta volumosa testando os mesmos aditivos contendo própolis e monensina (Prado, 2008) a MOADR também foi superior numericamente para o tratamento testemunha (3157,6 g/dia) em relação aos demais.

Houve efeito dos tratamentos experimentais ($P<0,05$) para a eficiência de síntese microbiana, (Tabela 6) tanto em relação a MOADR quanto para a matéria orgânica verdadeiramente degradável no rúmen (MOVDR). O tratamento LLOSC1 obteve maiores valores ($P<0,05$) de eficiência de síntese microbiana (65,1 g N-Mic/kg MOADR e 36,6 g N-Mic/kg MOVDR) em relação ao tratamento testemunha (38,2 g N-Mic/kg MOADR e 25,8 g N-Mic/kg MOVDR), porém não diferiu dos tratamentos contendo aditivos. Observou-se que o aumento da eficiência de síntese microbiana de LLOSC1 em relação ao tratamento testemunha foi de 70,42% para MOADR e 41,86% para MOVDR. Não houve diferença da eficiência de síntese microbiana para o tratamento testemunha em relação ao monensina e LLOSB3.

A média da eficiência de síntese microbiana aparente para o tratamento testemunha foi de 38,2 g N-Mic/kg MOADR o que foi semelhante ao valor considerado aceitável pelo ARC (1984) de 32,0 g N-Mic/kg MOADR.

Os valores de síntese microbiana para o tratamento LLOSC1 foram superiores aos reportados por Maeda (2007) de 57,7 g N-Mic/kg MOADR e 35,1 g N-Mic/kg MOVDR em búfalos alimentados com silagem de cana-de-açúcar 60:40, e também superiores ao reportado por Maeda *et al.* (2007) de 10,5 g N-Mic/kg MOADR em búfalos alimentados com dietas com níveis crescentes de concentrado.

Tabela 6 – Probabilidade (P) e coeficiente de variação (CV) das médias de teores de MO, nitrogênio total e purinas de microrganismos ruminais, ingestões de matéria orgânica (IMO) e nitrogênio (IN), fluxos omasal de MO, MO microbiana, N microbiano (N-mic), N não microbiano (NN-Mic) no omaso, MO aparentemente degradável no rúmen (MOADR) e MO verdadeiramente degradável no rúmen (MOVDR) e eficiência de síntese microbiana aparente e verdadeira para dietas contendo ou não produto LLOS à base de própolis e monensina em bubalinos

	Tratamento				P	CV
	Testemunha	Monensina	LLOSC1	LLOSB3		
Teor de MO mic	78,31	78,17	82,84	84,23	0,2513	5,7665
Teor de N total mic	6,26ab	5,77b	6,96a	6,69a	0,0157	5,6940
N mic em % da MO	7,99ab	7,40b	8,40a	7,94ab	0,0598	4,9516
RNA (g/kg)	0,1600	0,1543	0,1606	0,1681	0,5987	8,5576
IMO (g/dia)	9273,7	9016,7	9018,1	9261,3	0,6663	4,2610
IN (g/dia)	176,11	171,65	172,93	173,96	0,7720	3,5244
	Fluxo para o omaso					
MO g/dia	4507,1b	5493,6a	5663,9a	5218,3ab	0,0073	5,8579
MOmic g/dia	2278,7	2729,5	2597,9	2384,3	0,7101	23,6340
N (g/dia)	163,9b	183,7a	190,4a	186,3a	0,0047	3,5710
N-Mic (g/dia)	181,74	201,04	218,34	191,04	0,7174	23,2010
NN-mic (g/dia)	-17,8	-17,4	-27,9	-4,8	0,9134	271,695
MOADR (g/dia)	4766,5a	3523,0c	3354,2c	4043,0b	0,0002	7,7963
MOVDR (g/dia)	7045,3	6252,5	5952,0	6427,4	0,2212	10,2587
	Eficiência de síntese microbiana					
g N-Mic/kg MOADR	38,2b	56,1ab	65,1a	48,8ab	0,0580	20,8123
g N-Mic/kg MOVDR	25,8b	31,7ab	36,6a	29,8ab	0,0502	13,3827

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.¹ LLOS: produto à base de extrato de própolis com extração em diferentes teores alcoólicos (1 e 3) e diferentes concentrações de própolis (B e C), LLOSC1 e LLOSB3

Em bovinos alimentados com dieta volumosa e com os mesmos aditivos à base de própolis (Prado, 2008), houve um aumento numérico, porém não significativo com a adição de LLOSC1 em relação aos demais tratamentos para a eficiência de síntese microbiana tanto em relação a MOADR como para MOVDR (48,6 g N-Mic/kg MOADR e 31,2 g N-Mic/kg MOVDR).

A maior eficiência de síntese microbiana para o tratamento LLOSC1 pode ser confirmada pelos valores negativos de DR da PB que resultou em menor perda de PB na forma de nitrogênio amoniacal e provavelmente atribuída a melhor reciclagem de nitrogênio endógeno.

Ainda a melhora da eficiência da síntese microbiana do tratamento contendo LLOSC1 colabora com os resultados observados por Prado (2008) de que o produto selecionou bactérias ruminais generalistas capazes de degradar todos os substratos testados, como a celulose, celobiose, arabinose, xilose, frutose, lactose e glicose. Esta maior amplitude na degradação de carboidratos juntamente com a presença do

nitrogênio disponível pode ter refletido na maior eficiência de síntese microbiana quando LLOSC1 foi adicionado a dieta.

Conclusões

O produto contendo própolis LLOSC1 propiciou maior digestibilidade total e intestinal da matéria seca e nutrientes e maior eficiência de síntese microbiana, podendo ser uma alternativa ao uso da monensina sódica em búfalos alimentados com dietas volumosas. O aditivo LLOSB3 mostrou indícios de melhora na fermentação ruminal e sua dosagem deve ser melhor avaliada em futuros experimentos.

Literatura citada

- AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL - ARC. **Report of the protein group of the Agricultural Research Council Working party, on the nutrient requirement of ruminants**. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1984. 45p.
- BERNARDES, O., Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica, **Revista Brasileira de Reprodução animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, 2007.
- BELEZE, J.F.R. **Digestibilidade e parâmetros ruminais de rações com teores de concentrado e adição de ionóforos ou probiótico para bovinos e bubalinos**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005.161p. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Estadual de Maringá, 2005.
- BOCK, B. J.; HARMON D. L.; BRANDT Jr R. T. *et al.* Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. **Journal of Animal Science**. v. 69, p.2211–2224, 1991.
- BROUDISCOU, L.P.; PAPON, Y.; BROUDISCOU, A.F. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. **Animal Feed Science and Technology**, v.87, n.3-4, p.263-277, 2000.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. 1979. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Editora Livroceres. 380p.
- COLUCCI, P.E. **Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle**. Guelph:University of Guelph, 1984, 221p. Thesis (Ph.D. Thesis Animal Science) - University of Guelph, 1984.
- COLUCCI, P. E.; MACLEOD, G. K.; GROVUM, W. L.; *et al.* Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. **Journal of Dairy Science**. v.73, n.8, p.2143-2156, 1990.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p. 48-51, 1999.
- FRANZOLIN, R.; FRANZOLIN, M. H. T. População de protozoários ciliados e degradabilidade ruminal em búfalos e bovinos zebuínos sob a dieta à base de cana de açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, n.6, p.1853-1861, 2000.

- FRANZOLIN, R. Pesquisas em nutrição de bubalinos. En: **Anais** do II simpósio paulista de bubalinocultura. Pirassununga, Brasil. P.18, 2001.
- JOHNSON K. A.; JOHNSON, D.E., Methane emissions from cattle, **Journal of Animal Science**, v.75, p. 2483-2492, 1995.
- KIMURA, F.T.; MILLER, V.L. Chromic oxide measurement. Improved determination of chromic oxide in cow feed and feces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.5, p.216, 1957.
- KURAR, C. K.; MUDGAL, V. D. Maintenance requirements for protein in buffaloes. **Indian Journal Animal Science** v.51, n.6, p.817-823, 1981.
- KURIHARA, M.; MAGNER, T.; HUNTER, R. A.; McCRABB, G. J. Methane production and energy partition of cattle in the tropics. **British Journal of Nutrition**, v.81, p.227-234, 1999.
- LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Efeitos da Monensina sobre a fermentação e sensibilidade de bactérias ruminais de ovinos sob dietas ricas em volumoso ou concentrado. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.30, n.1, p.254-260, 2001.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; QUEIROZ, A. C. *et al.* Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.650-658, 2005.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; RODRIGUES, M. T. *et al.*, Óleo se soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras: consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n. 1, p. 191-197, 2007.
- LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; AZEVADO, J. A. G. *et al.* Técnica de coleta de digesta omasal para estudos de digestão parcial em bovinos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39. Recife, 2002. **Anais...** Recife:SBZ, 2002. CD ROM. Nutrição de ruminantes
- LIRA, G. M.; MANCINI FILHO, J.; TORRES, R.P. *et al.* Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.64, p.31-38, 2005.
- MAEDA, E. M. **Caracterização química, digestibilidade e degradabilidade de silagem de cana-de-açúcar com diferentes aditivos em bovinos e bubalinos.** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2007. 96p. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Universidade Estadual de Maringá, 2007.
- MAEDA, E.M.; ZEOULA, L.M.; GERON, L. J. V. *et al.* Digestibilidade e características ruminais de dietas com diferentes teores de concentrado para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.716-726, 2007
- MAENG, W.J., BALDWIN, R.L. 1976. Dynamics of fermentation of purified diet and microbial growth in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.4, p.636-642.
- NAGAJARA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. Manipulation of ruminal fermentation In:HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (eds). **The Rumen Microbial Ecosystem.** Blackie academic e professional. London, p.523-632, 1997.

- OEHEM F.W.; PICKRELL. J. An Analysis of the Chronic Oaral Toxicity of Polyether Ionophore Antibiotics in Animals. **Veterinary and Human Toxicology**. v.41, p.251-257, 1999.
- 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.
- OLIVEIRA, M. V. M.; LANA, R. P.; JHAM, G. N. *et al.* Influência da monensina no consumo e na fermentação ruminal em bovinos recebendo dietas com teores baixo e alto de proteína. **Revista Brasileira de Zootecnia** . v.34, n.5, p.1763-1774, 2005.
- OWENS, F. N.; ZINN, R. A.; KIM, Y.K. Limits to starch digestion in the ruminant small intestine. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1634-1648, 1986.
- PONTARA, P. P. M.; CASIMIRO, T. R.; ZEOULA, L. M. *et al.* Utilização do produto LLOS à base de própolis no desempenho de bezerras lactentes. In: **44ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia** – Unesp, Jaboticabal – SP, 2007.
- POTTER, E. L.; COOLEY, C.O.; RICHARDSON, L.F. *et al.* Effect of monensin on performance of cattle fed forage. **Journal of Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 665-669, 1976.
- PRADHAN, K.; BHATIA, S.K.; SANGWAN, D.C. Feed consumption pattern, ruminal degradation, nutrient digestibility and physiological reactions in buffalo and cattle. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.67, n.2, p.149-151, 1997.
- PRADO, O. P. P. **Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS)**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2005, 78p.
- PRADO, O. P. P. **Própolis e monensina sódica em dietas volumosas sobre a digestibilidade e características ruminais de bovídeos** Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, 2008, 92p.
- REGULAMENTO (CE) N°1831/2003 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO de 22 de setembro de 2003 - relativo aos aditivos destinados à alimentação animal **Jornal Oficial da União Européia L 268/29**, 18.10.2003.
- RUSSELL, J. B.; STROBEL, H. J. Effect of Ionophores on Ruminal Fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**. v.55, p.1-6. 1989.
- RUSSELL, J, B.; DOMBROWSKI, D. B. Effect of pH on the efficiency of growth by culteres of rumen bacteria in continous culture, **Applied and Environmental Microbiology**. v.39, p.604, 1980.
- SALLES, M. S. V.; LUCCI, C .S. Monensina para Bezerros Ruminantes em Crescimento Acelerado. 2. Consumo e Parâmetros Ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, p.582-588, 2000.
- SAS **Procedures guides**. Version 6. Cary [Estados Unidos] : SAS. Institute.
- SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **Britanic of Journal Nutrition**, v. 32, n.2, p.199-205. 1974.

- SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análises de alimentos**. 3.ed. UFV: Imprensa Universitária, 2002. 235p.
- SINGH, S.; PRADHAN, K.; BATHIA, S. K. Relative ruminal microbial profile of cattle and buffalo fed wheat straw-concentrate diet. **Indian Journal Animal Science**. v. 62, n. 12, p.1197-1202, 1992.
- SIVKOVA, K.; TRUFCHEV, H.; VARLIAKOV, I. Comparative studies on fermentation processes in the rumen and blood content of calves and buffalo calves I. Effect on diet, containing alfafa haylage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta: 1997. p.312-316.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P.J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 12, p.3562-3577, 1992.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A. C.; LANA, R. P. *et al.* Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004.
- TAKAISI-KIKUNI N. B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medicine**, v.60, n.2, p.222-227, 1994.
- TEWATIA, B. S.; BHATIA, S. K. Comparative ruminal biochemical and digestion related physiological characteristics in buffaloes and cattle fed a fibrous diet. **Buffalo Journal**, v.14, p.161-170, 1998.
- TRUFCHEV, H.; SIVKOVA, K.; ZANKOVA, M. Comparative studies on fermentation processes in the rumen and blood content of calves and buffalo calves. II. Effect on diet, containing maize silage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5., 1997, Caserta. **Proceedings...** Caserta: 1997. p.312-316.
- UDEN, P.; COLUCCI, P. E.; VAN SOEST, P. J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.31, n.7, p.625-632, 1980.
- VALADARES FILHO S. C.; PINA, D. S. **Fermentação ruminal**. In: Telma Teresinha Berchelli; Alexandre Vaz Pires; Simone Gisele de Oliveira. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2006, v. 1, p. 151-182.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, I. Effect of monensin on rumen metabolism in vitro. **Applied and Environmental Microbiology**, v.34, p.251-257, 1977.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VERRUMA M. R.; OLIVEIRA, A. J.; Avaliação química e nutricional do queijo mozzarella e iogurte de leite de búfala, **Sciencia Agrícola**, Piracicaba, v.50, n.3, p.438-443, 1993.
- VIEIRA, P. F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminante**. Viçosa, MG:UFV, 1980.98p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa, 1980.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os produtos LLOS contendo própolis selecionaram cepas de bactérias ruminais generalistas ou mais especialistas dependendo das concentrações no produto utilizado e do tipo de dieta testada, mostrando assim a capacidade seletiva do produto LLOS à base de própolis sobre as bactérias ruminais. Os produtos LLOS também selecionaram cepas de bactérias ruminais na maioria Gram-positiva indicando que a própolis possui mecanismo de ação diferente dos ionóforos, e a seleção aconteceu sem afetar a diversidade bacteriana e seus diferentes níveis de atividade metabólica.

Os produtos contendo própolis e monensina sódica tiveram efeitos negativos sobre os processos de digestão que refletiram em menores teores de nutrientes digestíveis totais para bovinos em crescimento alimentados com dietas à base de forragem. Sendo necessários maiores estudos para o emprego dos produtos LLOS em bovinos com vistas a melhorar a dose administrada *in vivo*.

O produto à base de própolis LLOSC1 propiciou maior digestibilidade total e intestinal da matéria seca e nutrientes e maior eficiência de síntese microbiana em bubalinos alimentados com dieta volumosa o que indica ser um aditivo alimentar natural promissor nessas condições de alimentação.

O aditivo LLOSB3 apresentou indícios de melhora na fermentação ruminal e sua dosagem deve ser melhor avaliada em futuros experimentos tanto em bovinos quanto em bubalinos.

APÊNDICES

Tabela 1 A- Percentagem das formas morfológicas de cepas tolerantes a diferentes tipos de LLOS obtidas de animais alimentados com dieta com 100% de silagem de milho e 50% de silagem de milho e 50% de concentrado

100% de silagem de milho							
Aditivo	Bastonete	Bastonete curvo	Cocobacilus	Diplococcus	Streptococcus	Staphilococcus	Total
LLOSC1	26,9	30,8	30,8	3,8	7,7	0,0	100,0
LLOSB3	21,7	17,4	34,8	17,4	8,7	0,0	100,0
Total	24,5	24,5	32,7	10,2	8,2	0,0	100,0
50% de silagem de milho e 50% de ração concentrada							
Aditivo	Bastonete	Bastonete curvo	Cocobacilus	Diplococcus	Streptococcus	Staphilococcus	Total
LLOSC1	27,3	4,5	50,0	4,5	9,1	4,5	100,0
LLOSD1	52,6	31,6	15,8	0,0	0,0	0,0	100,0
LLOSA2	50,0	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0	100,0
LLOSC3	64,7	11,8	17,6	0,0	0,0	5,9	100,0
Total	47,0	13,6	31,8	1,5	3,0	3,0	100,0

Tabela 2 A- Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos pelas cepas bacterianas tolerantes aos produtos LLOSC1 e LLOSB3 (à base de própolis) em dietas com 100% de silagem de milho.

Isolado	Gram	LLOS	Celulolíticos		Hemicelolíticos + Pectinolíticos		Fermentadores de açúcares solúveis		
			Celobiose	Celulose	Arabinose	Xilose	Frutose	Glicose	Lactose
331	G +	LLOSC1	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
340	G -	LLOSC1	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
103	G +	LLOSB3	(++)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
296	G +	LLOSB3	(++)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
317	G -	LLOSB3	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
248	G -	LLOSC1	(++)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
350	G +	LLOSB3	(++)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
147	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
162	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
249	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
302	G -	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
304	G -	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
305	G -	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
307	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
308	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)
334	G -	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
312	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
155	G +	LLOSB3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
298	G +	LLOSB3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
358	G -	LLOSB3	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
90	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
89	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
161	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
252	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(+)
333	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
99	G +	LLOSB3	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
228	G +	LLOSB3	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
257	G +	LLOSB3	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
111	G +	LLOSB3	(++)	(-)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)
9	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
151	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
233	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
107	G +	LLOSB3	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
140	G +	LLOSB3	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
152	G +	LLOSB3	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
154	G +	LLOSB3	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
230	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
253	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
332	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
116	G -	LLOSB3	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
254	G +	LLOSB3	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
345	G +	LLOSB3	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
158	G +	LLOSC1	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
102	G +	LLOSB3	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
146	G +	LLOSC1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
97	G +	LLOSB3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
101	G +	LLOSB3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
142	G +	LLOSB3	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
256	G +	LLOSB3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)

Tabela 3 A - Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos pelas cepas tolerantes aos produtos LLOSA2, LLOSC1, LLOSC3 e LLOSD1 (à base de própolis) em dietas com 50% de silagem de milho e 50 % de concentrado.

50% Silagem de milho e 50% ração concentrada									
Isolado	Gram	LLOS	Celulolíticos		Hemicelulolíticos + Pectinolíticos		Fermentadores de açúcares solúveis		
			Celobiose	Celulose	Arabinose	Xilose	Frutose	Glicose	Lactose
217	G -	LLOSA2	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
23D	G +	LLOSC1	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
73	G +	LLOSC3	(++)	(++)	(++)	(+)	(++)	(+)	(+)
274	G +	LLOSD1	(++)	(++)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
181	G +	LLOSC1	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
67	G +	LLOSC3	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
283	G +	LLOSC3	(++)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
51	G +	LLOSD1	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
284	G -	LLOSD1	(++)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
288	G -	LLOSD1	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
201	G +	LLOSA2	(+)	(++)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
77	G +	LLOSC3	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
164	G -	LLOSA2	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
165	G +	LLOSA2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
324	G +	LLOSA2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
180	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
190	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
221	G +	LLOSC1	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
71	G -	LLOSC3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
81	G +	LLOSC3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
278	G +	LLOSC3	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
279	G +	LLOSC3	(+)	(+)	(++)	(-)	(+)	(+)	(+)
280	G -	LLOSC3	(+)	(+)	(+)	(++)	(++)	(+)	(+)
293	G -	LLOSC3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
52	G -	LLOSD1	(+)	(+)	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)
63	G +	LLOSD1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)
286	G +	LLOSD1	(+)	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
328	G +	LLOSA2	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
11C	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
11D	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
14B	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
76	G +	LLOSC3	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
78	G +	LLOSC3	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
83	G +	LLOSC3	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
291	G -	LLOSC3	(++)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
24	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)
262	G +	LLOSC1	(++)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
70	G +	LLOSC3	(++)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
272	G +	LLOSD1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
273	G +	LLOSD1	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
287	G +	LLOSD1	(++)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)
171	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
264	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
268	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
270	G -	LLOSC1	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
271	G -	LLOSC1	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
129	G +	LLOSA2	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
176	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
222	G +	LLOSC1	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
295	G +	LLOSC3	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
127	G -	LLOSA2	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
220	G +	LLOSC1	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
59	G +	LLOSD1	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
174	G +	LLOSC1	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
74	G +	LLOSC3	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
54	G +	LLOSD1	(-)	(+)	(++)	(++)	(-)	(+)	(+)
289	G +	LLOSD1	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
184	G +	LLOSC1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
189	G +	LLOSC1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
56	G +	LLOSD1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
57	G +	LLOSD1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
133	G -	LLOSC1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
47	G +	LLOSD1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
48	G +	LLOSD1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
53	G +	LLOSD1	(-)	(-)	(++)	(+)	(-)	(+)	(+)
58	G +	LLOSD1	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Tabela 4 A - Capacidade de fermentação de diferentes carboidratos pelas cepas tolerantes ao produto LLOSC1 (à base de própolis) em dietas com 50% de silagem de milho e 50 % de concentrado

Isolado	Morfologia	Relação V:C	Gram	Celulolíticos		Hemicelulolíticos + Pectinolíticos		Fermen. de açúcares solúveis		
				Celobiose	Celulose	Arabinose	Xilose	Frutose	Glicose	Lactose
23D	Bastonete	50:50	G +	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
181	Cocobacillus	50:50	G +	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
331	Bastonete curvo	100:0	G +	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
340	Bastonete curvo	100:0	G -	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
248	Bastonete curvo	100:0	G -	(++)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
180	Cocobacillus	50:50	G +	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
162	Bastonete	100:0	G +	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
249	Bastonete	100:0	G +	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
302	Bastonete	100:0	G -	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
304	Bastonete curvo	100:0	G -	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
305	Bastonete curvo	100:0	G -	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
307	Bastonete curvo	100:0	G +	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
334	Bastonete curvo	100:0	G -	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
147	Bastonete	100:0	G +	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
308	Bastonete	100:0	G +	(+)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)	(+)
312	Bastonete	100:0	G +	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
190	Diplococcus	50:50	G +	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
90	Streptococcus	100:0	G +	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
221	Cocobacillus	50:50	G +	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
11C	Cocobacillus	50:50	G +	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
14B	Cocobacillus	50:50	G +	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
89	Cocobacillus	100:0	G +	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
161	Cocobacillus	100:0	G +	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
252	Cocobacillus	100:0	G +	(++)	(-)	(-)	(-)	(++)	(+)	(+)
11D	Cocobacillus	50:50	G +	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
333	Streptococcus	100:0	G +	(++)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
24	Bastonete	50:50	G +	(++)	(-)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)
262	Bastonete	50:50	G +	(++)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
171	Cocobacillus	50:50	G +	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
9	Bastonete	100:0	G +	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
233	Cocobacillus	100:0	G +	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
264	Streptococcus	50:50	G +	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
268	Bastonete	50:50	G +	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
270	Bastonete	50:50	G -	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
271	Staphilococcus	50:50	G -	(+)	(-)	(+)	(+)	(++)	(+)	(+)
151	Cocobacillus	100:0	G +	(+)	(-)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)
230	Cocobacillus	100:0	G +	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
332	Cocobacillus	100:0	G +	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
253	Cocobacillus	100:0	G +	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
176	Cocobacillus	50:50	G +	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
222	Cocobacillus	50:50	G +	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
220	Cocobacillus	50:50	G +	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
158	Bastonete curvo	100:0	G +	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)
174	Cocobacillus	50:50	G +	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
184	Bastonete curvo	50:50	G +	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
189	Streptococcus	50:50	G +	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
146	Diplococcus	100:0	G +	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
133	Bastonete	50:50	G -	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)