



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



Talita Almeida de Paula

**PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO* DE DIETAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE  
VOLUMOSO:CONCENTRADO**

RIO LARGO - AL

2014

TALITA ALMEIDA DE PAULA

**PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN*  
*VITRO* DE DIETAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE  
VOLUMOSO:CONCENTRADO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Zootecnia do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Federal de Alagoas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Patrícia M. G. Beelen

RIO LARGO - AL

2014

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**  
**Bibliotecário Responsável: Valter dos Santos Andrade**

P234u

Paula, Talita Almeida de.

Própolis vermelha de Alagoas sobre a fermentação ruminal *in vitro* de dietas com diferentes proporções de volumoso: concentrado / Talita Almeida de Paula – 2014.

39 f. : il.

Orientadora: Patrícia Mendes Guimarães Beelen.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Própolis vermelho – Alimentação – Ruminantes. 2. Gás carbônico Produção (In Vitro). 3. Metano – Produção (In Vitro). 4. Fermentação (Técnicas In Vitro). I. Título.

CDU: 636.087.6:636.2

## TERMO DE APROVAÇÃO

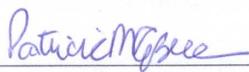
TALITA ALMEIDA DEPAULA

### PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *IN VITRO* DE DIETAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUMOSO:CONCENTRADO

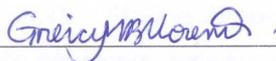
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovada em 06/08/2014



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Mendes Guimarães Beelen  
Orientadora (CECA-UFAL)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Greicy Mitzi Bezerra Moreno  
Membro (CECA/ARAPIRACA)



Prof. Dr. Roger Nicolas Beelen  
Membro (CECA/UFAL)

Rio Largo – AL

2014

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus que me deu força e coragem e tem me abençoado constantemente.

Ao programa de Pós Graduação em Zootecnia por ter dado suporte para que eu concluísse o curso de Mestrado, aos professores que se dedicaram a nos transmitir conhecimento, e aos funcionários que sempre estavam dispostos a nos ajudar.

A professora Patrícia Beelen, por ter me orientado, e me apoiado o desenvolvimento desse trabalho.

Ao professor Fernando Souza que ajudou grandemente no desenvolvimento do trabalho.

A Talma Jordana por ter sido fundamental na execução do trabalho, e pelo companheirismo em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis.

A Pablo Castagnino por toda ajuda dada, e pela disponibilidade de nos ensinar.

Aos colegas do Mestrado pelas conversas descontraídas e pelo companheirismo.

Aos meus pais Jailton Lira e Marina Almeida, que me incentivam, ajudando e consolando, e principalmente por terem acreditado no meu potencial, além de suprir todas as minhas necessidades.

A minha irmã Mainah Almeida que sempre foi exemplo de determinação e coragem.

Ao meu esposo Marcos Elias, pelo incentivo, companheirismo, conselhos e broncas dados nas horas que precisei.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”

**Martin Luther King**

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	6
<b>1 CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	6
<b>1.1 Impacto dos ruminantes sobre o meio ambiente</b> .....	7
<b>1.2 Perda de energia alimentar</b> .....	8
<b>1.3 Uso de aditivos na alimentação animal</b> .....	8
1.3.1 Própolis na alimentação animal.....	9
<b>1.4 Própolis vermelha de alagoas</b> .....	11
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	15
<b>CAPÍTULO II: EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL <i>in vitro</i> DE DIETAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUMOSO: CONCENTRADO</b> .....	20
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
<b>2.1 Extrato etanólico de própolis</b> .....	24
<b>2.2 Dietas</b> .....	24
<b>2.3 Estudo <i>in vitro</i></b> .....	25
<b>2.4 Estudo estatístico</b> .....	27
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	37

## CAPÍTULO I

### 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O rebanho brasileiro em 2012 ultrapassou 211 milhões de bovinos, mais de 8 milhões de caprinos e 16 milhões de ovinos, totalizando um rebanho de ruminantes de mais de 235 milhões de animais (IBGE, 2013). Por esse crescimento acentuado, o Brasil vem assumindo importante posição mundial sobre a produção de ruminantes domésticos (SOUSA et al., 2013).

A criação de ruminantes tem recebido importante destaque no mundo, não só por sua colaboração na alimentação da população que vem crescendo intensamente, mas também porque esses animais são responsáveis pela emissão de gases de efeito estufa (metano e gás carbônico), dificultando a dissipação de calor na terra e destruindo a camada de ozônio (PEREIRA et al., 2006; PRIMAVESI et al., 2004). Além disso, quando esses gases são produzidos durante a digestão dos animais ruminantes, parte da energia proveniente do alimento é perdida (McGUFFEY et al., 2001).

Com o intuito de reduzir os efeitos dos animais ruminantes sobre o meio ambiente, além de promover um melhor aproveitamento do valor energético da dieta, algumas alterações na alimentação dos animais podem ser feitas (BERCHIELLI et al., 2003). Uma das alternativas mais utilizadas na tentativa de reduzir a produção desses gases a nível ruminal é a utilização de ionóforos. No entanto, a União Europeia vem impondo restrições e proibições a utilização desses produtos, alegando que eles podem causar resistência de bactérias indesejáveis.

A pressão global para redução de fontes antrópicas de gases de efeito estufa, associado a possível ameaça da União Europeia de embargar produtos de origem animal que não tenham sido criados de forma sustentável, sugere a necessidade de encontrar formas de reduzir a emissão desses gases, sem que haja riscos à saúde dos animais e a humana.

Uma alternativa que tem sido estudada, e que atende as necessidades de proteção à saúde, é a utilização de própolis, já que este é um produto natural, e muitos pesquisadores acreditam que sua função no rúmen é semelhante a dos ionóforos.

Uma própolis que têm sido bastante estudada é a Própolis Vermelha de Alagoas, que recebeu o selo de indicação geográfica em 2013.

### **1.1 Impacto dos ruminantes sobre o meio ambiente**

As maiores produções de metano global são provenientes das atividades agropecuárias (BERNDT, 2010). Os herbívoros ruminantes produzem metano como parte da digestão a nível ruminal (PRIMAVESI et al., 2004), no processo de fermentação entérica (PEDREIRA et al., 2005).

A criação de animais ruminantes é a 2<sup>o</sup> maior fonte de metano antrópico global, contribuindo com 22% do metano emitido no meio ambiente, ficando atrás apenas dos combustíveis fósseis, que contribui com 28% desse gás (PEDREIRA et al., 2005).

De acordo com Thorpe (2008), o Brasil é o segundo maior emissor de CH<sub>4</sub> entérico mundial, ficando atrás apenas da Índia, que possui o maior número de animais ruminantes do mundo. No Brasil, a fermentação entérica dos ruminantes foi responsável por 87% do CH<sub>4</sub> emitido pelo setor agropecuário em 2010, sendo a maior parte desta emissão oriunda dos bovinos, com um total de 11.741,4 Gg CH<sub>4</sub>. Enquanto que o CO<sub>2</sub>, foi responsável por mais de 246.569 Gg CO<sub>2</sub>eq, sendo a fermentação ruminal a via de maior contribuição do setor agropecuário. Isto representou 56% das emissões em 2010 (MCTI, 2013).

A emissão desses gases na atmosfera provoca destruição da camada de ozônio (PRIMAVESI et al., 2004) e há maior dificuldade na dissipação do calor (McGUFFEY et al., 2001).

A dieta a qual o animal é submetido, por influenciar as taxas de carboidratos fermentados e sua taxa de passagem pelo rúmen, é um dos fatores que afetam a produção de gases de efeito estufa. Quando há uma alta relação acetato:propionato há uma maior formação de metano, pois mais hidrogênios ficam livres no meio ruminal e se ligam aos carbonos também disponíveis, havendo então a formação do metano (JOHNSON & JOHNSON, 1995). Esses fatores têm incentivado pesquisas que relacionam os efeitos dos animais sobre as mudanças climáticas mundiais (BERCHIELLI et al., 2003).

Modificações da fermentação ruminal com aditivos alimentares são estudados e utilizados para uma melhoria do desempenho zootécnico, resultando

em um maior crescimento do animal por unidade de produto, como leite ou carne. Esses estudos devem estar associados a possibilidade de diminuição da emissão de metano por unidade de produto produzido (PEREIRA, 2013). E o desenvolvimento de estratégias de produção de forma que a pecuária interfira menos na questão do aquecimento global (BERCHIELLI et al., 2003).

## **1.2 Perda de energia alimentar**

A produção de metano e dióxido de carbono no rúmen é responsável por perdas energéticas pelo animal (PEREIRA et al., 2006, STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004). A formação de metano no rúmen chega a representar até 12% da energia alimentar que pode ser perdida através da eructação (McGUFFEY et al., 2001).

Sabe-se que o metano é produzido pelos microrganismos para eliminar o hidrogênio que está livre no meio ruminal, pois esse hidrogênio causa pressão no rúmen, e se a pressão estiver alta não há fermentação, conseqüentemente não há formação de ácido graxo de cadeia curta (AGCC). A fermentação ruminal pode ser manipulada para que haja maior produção de propionato, assim haverá mais utilização do carbono e dos hidrogênios livres, e conseqüentemente menor produção de metano (PEREIRA, 2013; STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).

Para que haja maior formação de propionato no rúmen, proporcionando redução de hidrogênios livres, e obtendo-se menor perda de energia alimentar, pode-se utilizar dietas com maiores teores de alimentos concentrados (PEREIRA, 2013).

No entanto, a utilização de concentrados na alimentação dos animais torna a ração muito onerosa, elevando o custo da produção animal (EIFERT et al., 2004).

## **1.3 Uso de aditivos na alimentação animal**

Para otimizar a produção animal, e reduzir a ação negativa dos ruminantes sobre o meio ambiente, aditivos vem sendo utilizados na alimentação desses animais (ITAVO, 2008). Os ionóforos, são aditivos que tem grande efeito sobre os produtos finais da fermentação, e são largamente utilizados na alimentação de ruminantes, pois tem ação sobre bactérias ruminais específicas (McGUFFEY et al., 2001).

A ação dos ionóforos no meio ruminal, é justificada pelo efeito que este tem sobre as bactérias gram-positivas (produtoras de acetato), com pouco ou nenhum efeito sobre as bactérias gram-negativas (produtoras de propionato). Os ionóforos tem ação bacteriostática, e não bactericida, acarretando em crescimento das bactérias gram-positivas quando os ionóforos deixam de ser ofertados aos animais (ÍTAVO, 2008; STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).

Como o uso de ionóforos é considerado de risco crescente, por causa do risco de intoxicação dos animais, e possível resistência das bactérias (RÍSPOLI et al., 2009). Por esses motivos, os órgãos oficiais da União Europeia, impuseram restrições e proibições ao uso de ionóforos, com intenção de prevenir a resistência humana a bactérias. Pesquisas tem buscado produtos alternativos para substituir esses aditivos na produção animal, que tenham ação semelhante, mas sem causar riscos à saúde humana (OLIVEIRA, 2012).

Por possuir diferentes propriedades biológicas, e ser um produto natural, a própolis tem despertado o interesse de pesquisadores para utilização como aditivo na alimentação de animais ruminantes (OLIVEIRA, 2012; SIMIONI, 2011).

### 1.3.1 Própolis na alimentação animal

A própolis é um produto natural produzido por abelhas, é um material lipofílico, resinoso, com aroma forte e tem coloração variada de acordo com a sua origem, é encontrado em tons que variam desde o amarelo-esverdeado até o negro (MARCUCCI, 1995; LUSTOSA et al., 2008; SFORCIN, 2009).

Desde a antiguidade a própolis é usada intensamente. Os egípcios usavam própolis para embalsamar cadáveres, os romanos e gregos como remédio, e os incas utilizavam como antitérmico. Entre os séculos 17 e 20 a própolis se tornou uma droga natural popular na Europa, pela sua atividade antibacteriana (CASTALDO & CAPASSO, 2002).

Para formar a própolis, as abelhas *Apis mellifera* coletam exsudatos resinosos de diferentes partes das plantas, como broto, botões florais, etc. (PARK et al., 2002), as quais adicionam secreções, formando um composto adesivo (BONVEHÍ et al., 1994).

A mistura para produzir a própolis é processada pelas abelhas dentro da colmeia, e tem diferentes proporções de resinas, secreções glandulares das

abelhas, cera e pólen. Sua composição química vai variar de acordo com a origem vegetal da resina, a localidade, e o clima de onde foi coletada, tendo geralmente em sua composição, 55% de resina e bálsamo, 30% de cera, 10% de óleos vegetais e 5% de pólen (PAULINO, 2004), além de flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos graxos, fenóis, aminoácidos, vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C e E, e minerais, como manganês, cobre, cálcio, alumínio, níquel, zinco, vanádio e cromo (SILVA, 2009).

A própolis é usada pelas abelhas para diminuir a abertura de entrada e saída, preencher rachaduras ou lacunas, auxiliando na defesa e regulação térmicas das colmeias, mumificar insetos invasores que as abelhas matam dentro das colmeias, evitando que esses entrem em decomposição e putrefação (CASTALDO & CAPASSO, 2002; FERNANDES JÚNIOR, 2006).

A ação da própolis sobre o metabolismo ruminal se dá de forma a reduzir a quantidade de bactérias gram-positivas, que são as principais digestoras da fração fibrosa, e tem elevada ação específica na produção de amônia, metano, acetato e CO<sub>2</sub> no rúmen (SIMIONE, 2011), sendo esta a principal perda de energia do metabolismo ruminal (FREITAS, 2009).

Os resultados encontrados por muitos pesquisadores mostram respostas positivas quando são utilizadas fontes de própolis na alimentação de ruminantes. Simione (2011), ao estudar diferentes doses de produtos comerciais a base de própolis, como aditivo alimentar para bovinos de corte, observou que as diferentes doses utilizadas não alteraram o consumo alimentar, a digestibilidade aparente dos nutrientes, produção microbiana e as concentrações de glicose sanguínea, ureia e imunoglobulina G dos animais, enquanto que o desempenho animal e a eficiência desses foi aumentada.

Analisando diferentes alimentos, pela técnica *in vitro* de produção de gás, Stradiotti Júnior et al. (2004), observaram que a própolis é capaz de inibir a produção de gases dos microrganismos ruminais, e aumentar a taxa de degradação dos carboidratos.

O extrato de própolis pode ser usado na manutenção das condições ruminais, proporcionando melhorias na produção de leite de vacas. Segundo Freitas (2009) e Gonsalves Neto & Pedreira (2009) isso ocorre possivelmente pelo aumento de aminoácidos na glândula mamária, ocasionada pelo escape de proteína, para digestão no intestino delgado e pela redução de produção de gases no rúmen,

aumentando a concentração total de AGCC e possibilitando aos ruminantes maior produtividade.

As atividades biológicas das diferentes própolis são determinadas pela variação em sua composição química (BANKOVA, 2005). No Brasil, segundo Park et al. (2002), existiam 12 tipos de própolis, sendo a diferença entre elas causada pelas plantas da qual a resina é coletada. Contudo, essas própolis não são encontradas em todo o país, cada uma pode ser encontrada apenas em determinadas localidades, em função da variedade de plantas.

Recentemente, um novo tipo de própolis foi identificado no estado de Alagoas, a Própolis Vermelha de Alagoas, que tem sido encontrada unicamente no Nordeste do país. Nessa própolis já foram identificados compostos nunca vistos antes em própolis do Brasil, como isoflavonóides de alto poder antioxidante, como a homopterocarpina, medicarpina e 4, 7-dimetoxi-2-isoflavonol (ALENCAR, 2007; CABRAL, 2008).

#### **1.4 Própolis vermelha de alagoas**

Segundo Cabral (2008), a nova própolis do Brasil possui composição química exclusiva e cor vermelha intensa. Segundo Alencar et al. (2007) esta própolis apresenta características distintas das outras 12 própolis brasileiras anteriormente identificadas por Park et al. (2002). Além de possuir atividades biológicas comuns das outras própolis, como atividades antibacteriana, antimicótica, e antioxidante, que são as principais funções que a própolis tem na colmeia contra microrganismos patogênicos (TRUSHEVA et al., 2006). Contudo nenhum dos compostos identificados como padrão, aqueles que são comumente identificados em própolis do Brasil, foi encontrado nessa própolis (ALENCAR et al., 2007).

Segundo Dausch et al. (2006), a própolis vermelha é formada a partir de exudato resinoso vermelho coletado da superfície de *Dalbergia ecastophyllum*, planta que é comumente encontrada em mata ciliar. Algumas abelhas que tem suas colmeias em locais com pouca abundância dessa espécie, tem em sua própolis misturas de resinas, e menor atividade antimicrobiana.

Na Figura 1 estão apresentadas a resina sobre *Dalbergia ecastophyllum*, e a Própolis Vermelha de Alagoas.



Figura 1: À esquerda resina sobre *Dalbergia ecastophyllum*, Fonte: meliponariojandaira.blogspot.com.br À direita Própolis Vermelha de Alagoas, Fonte: Cabral, 2011

Por suas propriedades biológicas, a Própolis Vermelha de Alagoas tem despertado grande interesse do meio científico, bem como no mercado internacional (CABRAL, 2008), pois essa própolis não tem sido encontrada em outro lugar (SILVA et al., 2008).

A Própolis Vermelha de Alagoas tem sido comparada a própolis vermelha de Cuba, no entanto, a origem botânica delas é diferente, sendo que a fonte de resina da própolis cubana é *Clusia rósea*, e a origem botânica da Própolis Vermelha de Alagoas foi identificada como a *Dalbergia ecastophyllum* (ALENCAR et al., 2007), sendo assim o primeiro relato de própolis brasileira que tem origem botânica de uma leguminosa. Por essa própolis apresentar o perfil químico diferente das outras 12 própolis classificadas anteriormente por PARK em 2002, a própolis vermelha foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira (CABRAL, 2008).

Independentemente da classe a qual a própolis pertence, suas propriedades características antimicrobiana, antifúngica e citotóxica, estão diretamente ligadas aos flavonoides (ADELMANN, 2005; CASTALDO & CAPASSO, 2002; SIMIONI, 2011).

A Própolis Vermelha de Alagoas tem se destacado, dentre as demais própolis brasileiras, não só por sua coloração e origem botânica diferenciada, mais também por sua composição química com compostos até então inéditos em própolis brasileiras, como isoflavonóides de alta atividade antioxidante, como a homopterocarpina, medicarpina e 4, 7-dimetoxi-2-isoflavonol (CABRAL, 2008).

Na Tabela 1 estão os compostos identificados na Própolis Vermelha de Alagoas, por Alencar et al. (2007).

Tabela 1: Compostos identificados na Própolis Vermelha de Alagoas

TR (min)	Própolis vermelha do Brasil
9.88	Ester dimetílico do ácido butanedioico
12.46	Ester dimetílico do ácido hidróxido-butanedioico
15.31	<i>m</i> -guaiacol
16.82	1-Methoxy-4-(1-propenil)-benzeno
19.67	Metil- <i>o</i> -orselinato
21.27	methyl <i>o</i> -orsellinato
23.14	1,2,3-Trimethoxi-5-(2-propenil)-benzeno
24.21	Methoxieugenol
30.26	Éster metílico do ácido hexadecanóico
33.38	Éster metílico do ácido 10-octadecenóico
36.40	Metil abietato
37.11	Ácido benzoico
40.41	Homopterocarpina
41.39	Medicarpina
41.74	2,4,6-Trimetilfenol
43.79	4',7-Dimethoxi-2'-isoflavonol
44.41	7,4'-Dihidroxiisoflavona
44.86	2 <i>H</i> -1-Benzopirano-7-ol
45.66	2,2,6-Beta-trimethyl-biciclo(4.3.0)non-9(1)-en-7.alfa.-ol
46.37	1,1,2-Trimetil-3,5-bis(1-metiletenil)-, (2.alfa., 3.alfa., 5.beta.)-ciclohexano

Metodologia utilizada- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)  
 Fonte: ALENCAR et al., 2007

## 1.5 Isoflavonóides

Os isoflavonóides ou isoflavonas são amplamente encontrados no reino vegetal, são compostos químicos fenólicos pertencentes à classe dos fitoestrógenos. Esses compostos têm sua maior concentração em plantas leguminosas (ESTEVES & MONTEIRO, 2001), e são produzidos pelas plantas para desempenhar papel natural de defesa contra organismos patógenos, como bactérias e fungos (FRANÇA et al., 2001; TAIZ & ZEIGER, 2004).

Ao entrar em contato com microrganismos patógenos, as plantas desenvolvem o fenômeno chamado de resistência sistêmica adquirida (SAR), formando compostos de defesa. Um desses compostos são os isoflavonóides, que têm diferentes atividades biológicas na planta, como antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobiana, e anticancerígena, e os produtos que os contém se tornam alimentos funcionais e nutracênicos (AGUIAR, 2002; TAIZ & ZEIGER, 2004).

A presença de isoflavonóides na Própolis Vermelha de Alagoas é justificada pela origem botânica da resina coletada pelas abelhas, a planta leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* (CABRAL, 2008).

Em função do exposto acima, o objetivo do presente estudo foi testar o efeito do extrato de Própolis Vermelha de Alagoas sobre a fermentação ruminal. Os resultados obtidos estão apresentados em forma de artigo científico a ser submetido à publicação na Revista Caatinga.

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 20, n. 2, p. 323-334, jul./dez. 2002.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian própolis: Red própolis. **Jornal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 113, n.2, p.278- 283, 2007.

ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flor e bioatividade antimicótica/ antioxidante**. 2007. 186p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BONVEHI, J. S.; COLL, F. V.; JORDÁ, R. E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 71, n. 5, p. 529-532, 1994.

BANKOVA, V.; Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. vol. 2, no. 1, pp. 29–32, 2005.

BERCHIELLI, T. T.; PEDREIRA, M. dos S.; OLIVEIRA, S. G. de O.; PRIMAVESI, O.; LIMAS, M.; FRIGUETO, R.; Determinação da produção de metano e PH ruminal em bovinos de corte alimentados com diferentes relações volumoso: concentrado. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 40, 2003, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria: SBZ, 2003. Disponível na internet em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/46507/8/PROCI2003.00036.pdf>, acesso em 11 Dez 2013.

BERNDT, A. Estratégias nutricionais para redução de metano. In: Congresso latino americano de nutrição animal 4, 2010, São Pedro, SP. **Anais...** São Pedro: CLANA: CBNA: AMENA, 2010. Disponível na internet <

[http://www.simcorte.com/index/Palestras/7\\_simcorte/simcorte8.PDF](http://www.simcorte.com/index/Palestras/7_simcorte/simcorte8.PDF)> Em 11 Dez 2013.

CABRAL, I. S. R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana de própolis vermelha brasileira**. 2008. 95p. *Dissertação de mestrado em Ciências de Alimentos*. Universidade de São Paulo. Piracicaba, São Paulo. 2008.

CASTALDO, S.; CAPASSO, S. Própolis, a old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**. São Paulo, V. 73, Suppl. 1, 2002.

CHANG, R.; PILÓ-VELOSO, D.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. **Revevista Brasileira de Farmacologia** 18: 549-556. 2008.

DAUGSCH A.; MORAES C.S.; FORT P.; PACHECO E.; LIMA I.B.; ABREU J.Á.; PARK, Y.K. Própolis Vermelha e sua origem botânica. **Mensagem Doce**. 2006, nº 89, disponível em: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>. Acessada em novembro de 2013.

EIFERT, E. da C.; RESTLE, J.; PASCOAL, L. L.; BRONDAN, I. LUIZ; NEUMANN, M.; SILVA, J. H. S. DA; CARLOTTO, S. B. Bezerros de corte desmamados precocemente alimentados com silagem de triticales associada a diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.33, no.6, suppl.1, p.1806-1813. Dez 2004.

ESTEVES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, vol.14 nº.1 Campinas Jan./Apr. 2001.

FRANÇA, S. C.; ROBERTO P. G.; MARINS, M. A.; PUGA, R. D.; RODRIGUES A.; PEREIRA J. O. Biosynthesis of secondary metabolites in sugarcane. **Genetics and Molecular Biology**. 24 (1-4), 243-250. 2001.

GONSALVES NETO, J.; PEDREIRA M. S. Uso da própolis na nutrição de ruminantes. **ACSA - Agropecuária Científica no Semi-Árido**, v.05, 16-21, 2009.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas. **Produção da pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v.39, 63 p. 2012

ÍTAVO, C. C. B. F. **Própolis ou monensina sódica como aditivo para cordeiros terminados em confinamento**. 2008. 63 f. *Tese (Doutorado em Zootecnia)* - Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008.

JOHNSON K.A, JOHNSON D.E. Methane Emissions from Cattle. **Journal Animal Science**. 73:2483- 2492. 1995.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie** 26.2: 83-99. 1995.

McGUFFEY, R.K.; RICHARDSON, L. F.; WILKINSON, J. I. D. Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. **Journal of Dairy Science**, v. 84, suppl. E., p.E194-E203, 2001.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA TECNOLOGIA E INFORMAÇÃO – MCTI. **Estimativas anuais de emissões de gases de efeito estufa no Brasil**. Brasília. 2013. 80p. Disponível na web: <http://gvces.com.br/arquivos/177/EstimativasClima.pdf>, acesso em fevereiro 2014.

OLIVEIRA, J.S. **Utilização da monensina e da própolis para manipulação e fermentação ruminal em bovinos**. 2005. 76f. *Dissertação (Mestrado em Zootecnia)* - Universidade Federal de Viçosa, 2005.

OLIVEIRA, F. A. M. **efeito da adição da mistura de própolis na dieta de novilhas nelore na qualidade de oócitos e produção *in vitro* de embriões**, 2012. 28f. *Dissertação (Mestrado em Zootecnia)* - Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

PARK Y.K.; ALENCAR S.M.; SCAMPARINE A.R.P.; AGUIAR C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**. 2: 997-1003. 2002.

PAULINO, F. D. G. (2004). Produtos da colmeia. In: SOUZA, D. C. (Ed.). **Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural**. Brasília: SEBRAE. 187p.

PEREIRA, L. G. R. Métodos de avaliação e estratégias de mitigação de metano entérico em ruminantes. **Revista Colombiana de Ciências Pecuárias**. 26:264-277. 2013

PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T.; PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, [S.l.], Mai. 2005.

PEREIRA E.M.O; EZEQUIEL J.M.; BIAGIOLI B.; FEITOSA J. Determinação In Vitro do Potencial de Produção de Metano e Dióxido de Carbono de Líquido Ruminal Proveniente de Bovinos de Diferentes Categorias. **Arquivo Latino americano de Produção Animal**. 14: 120-127. 2006.

PRIMAVESI, O.; FRIGHETTO, R. T. S.; PEDREIRA, M. dos S.; LIMA, M. A. de; BERCHIELLI, T. T.; BARBOSA, P. F. Metano entérico de bovinos leiteiros em condições tropicais brasileiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, p. 277-283, 2004.

RÍSPOLI, T.B.; RODRIGUES, I.L.; MARTINS NETO, R.G.; KAZAMA, R.; PRADO, O.P.P.; ZEOULA L.M.; ARCURI, P;B. Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. **Pesquisa agropecuária brasileira**. Brasília, v.44, n.1, p.92-97, jan. 2009.

SFORCIN, J. M. (2009), **Própolis e imunidade**. São Paulo: Editora UNESP.

SILVA A.F. **Própolis**: caracterização físico-química, atividade antimicrobiana e antioxidante. Tese de Doutorado. UFV – Universidade Federal de Viçosa. 2009, 145 p. 2009.

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis a new of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V.5. p.313-316. 2008.

SIMONI, F.L. **Própolis como aditivo alimentar para Bovinos de corte**. Maringá: Tese Doutorado. Universidade Estadual de Maringá, 2011.

SOUSA, A. L. da S. O.; ATHAYDE, A. C. R.; OLINTO, F. A. Sensibilidade dos nematóides gastrintestinais de caprinos leiteiros à anti-helmínticos no município de Sumé, Paraíba, Brasil. **Revista ACSA**. V.9, n.2, p.33-36, abr- jun, 2013.

STRADIOTTI JR., D., QUEIRÓZ, A.C., LANA, R.P. PACHECO, C.G., CAMARDELLI, M.M. L., DETMANN, E., EIFERT, E.C., NUNES, P.M.M., OLIVEIRA, M.V.M., 2004. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 33:1093-1099. 2004.

TAIZ, L; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

THORPE A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. **Climatic change**. 93:407431. 2009.

## **CAPÍTULO II: EFEITO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS VERMELHA DE ALAGOAS SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL *in vitro* DE DIETAS COM DIFERENTES PROPORÇÕES DE VOLUMOSO: CONCENTRADO**

### **RESUMO**

Objetivou-se estudar o efeito do extrato de Própolis Vermelha de Alagoas sobre a fermentação ruminal *in vitro* de duas dietas com diferentes proporções de volumoso:concentrado. Foram utilizadas quatro concentrações de extrato de Própolis Vermelha de Alagoas (0, 20, 40 e 60%), para cada dieta com concentração volumoso:concentrado (70:30 e 50:50). A escolha das concentrações de Extrato de Própolis Vermelha foi baseada em estudos de própolis marrom. As dietas foram compostas por capim tifton, e farelos de milho e soja. Foi realizada análise bromatológica dos ingredientes das dietas, para se obter os teores de matéria seca (MM), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB) e fibra em detergente neutro (FDN). Foram estimados, por equações a digestibilidade *in vitro* da matéria orgânica, os carboidratos totais (CTHO) e carboidratos não fibrosos (CNF). A técnica para avaliação da fermentação ruminal utilizada foi a de produção de gás *in vitro*, onde foram utilizadas sete repetições. Foi observado efeito da adição de própolis ( $P < 0,05$ ) sobre os parâmetros de produção máxima de gás (A), pH, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub>. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da inclusão de própolis sobre a N-NH<sub>3</sub>. Os maiores valores de potencial máximo de produções de gás (A), 67,10 mL/gMS e 85,42 mL/gMS, foram encontrados nos tratamentos que não receberam própolis, nas duas dietas estudadas. A inclusão da própolis reduziu drasticamente o potencial de produção de gás das dietas, que passou a se manter na faixa dos 20 mL/gMS, independentemente do nível de inclusão e da dieta ( $P > 0,05$ ). Houve redução da produção de metano e CO<sub>2</sub> ( $P < 0,05$ ) com a inclusão de extrato de própolis nas dietas que não receberam própolis, contudo esses resultados podem ser consequência de uma paralização da fermentação ruminal. O extrato de Própolis Vermelha de Alagoas como aditivo na alimentação de ruminantes não pode ter sua concentração baseada em concentrações testadas do extrato de própolis marrom, uma vez que a menor concentração testada causou drástica redução da fermentação ruminal.

Palavras-chave: gás carbônico, metano, produção de gás *in vitro*

## EFFECT OF ALAGOAS RED PROPOLIS EXTRACT ON *in vitro* RUMINAL FERMENTATION OF DIETS WITH DIFFERENT PROPORTION OF FORAGE: CONCENTRATE

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the effect of Alagoas Red Propolis extract on *in vitro* ruminal fermentation of diets with different proportion of forage:concentrate. Four concentrations of Alagoas Red Propolis extract (0, 20, 40 and 60%), based on previously studies with brown propolis, and two diets with 70:30 and 50:50 proportion of forage:concentrate were used. The percentages of dry matter (DM), mineral matter (MM), ether extract (EE), crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and estimated the *in vitro* digestibility of organic matter, energy value, total carbohydrates (TCH) and non-fiber carbohydrates (NFC) were analyzed. The ruminal kinetics was estimated by the *in vitro* gas production technique, with seven repetitions per treatment. The pH, NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> were analyzed at 24 hours of incubation. The FRANCE model was used to estimate the kinetics of the fermentation and Tukey's test and F-Snedecor means for comparing the parameters of gas production. A effect of propolis addition ( $P < 0.05$ ) on the parameters of maximum gas production potential, pH, CO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> was observed. The highest values of maximum gas production potential (67.0 mL/gDM and 85.42 mL/gDM) were observed in the treatments without propolis. The inclusion of propolis dramatically reduced the gas production potential of diets, which dropped to the range of 20 mL/gDM, regardless of extract concentration and diet ( $P > 0.05$ ). There was a reduction in the production of methane and CO<sub>2</sub> ( $P < 0.05$ ) with the inclusion of propolis extract in the control diet, however, these results may be due to a reduction in rumen fermentation. The Alagoas Red Propolis extract as a feed additive for ruminants cannot have its concentration based on previously studies with brown propolis extract, since the lowest concentration used caused a drastic reduction of ruminal fermentation.

**Keywords:** methane, carbon dioxide, *in vitro* gas production

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos provenientes dos animais são muito importantes para a alimentação humana, por fornecem nutrientes, além da vantagem dos animais serem usados como força de trabalho. Os animais ruminantes possuem características peculiares, relacionadas a sua capacidade de ingestão de determinados alimentos, que os destacam de outros animais domésticos. Sua capacidade em aproveitar alimentos fibrosos, e fontes de nitrogênio não proteico, são uma grande vantagem produtiva sobre animais não ruminantes, essas vantagens estão relacionadas com a simbiose existente entre os ruminantes e os microrganismos que habitam o rúmen (OLIVEIRA, 2006).

Esses microrganismos são responsáveis pela fermentação dos alimentos, no entanto, também produzem metano, CO<sub>2</sub> e amônia, que podem representar perdas energéticas, menor desempenho produtivo, além de poluição ambiental.

A utilização de alimentos volumosos, a princípio, torna os produtos de origem animal mais competitivos, já que essa alimentação diminui os custos de produção (FAVORETO et al., 2008).

O Brasil vem se destacando na emissão desses gases poluentes, não só por possuir o maior rebanho comercial mundial de bovinos (THORPE, 2008), mas também por ter forragem como base alimentar dos animais ruminantes.

No entanto, as perdas energéticas decorrentes do aproveitamento de forragens, muitas vezes mal manejadas, reduzem as respostas produtivas dos animais e conferem ineficiência ao sistema produtivo. Esses fatos têm incentivado pesquisas relacionadas com os impactos ambientais causados pela produção animal (PEDREIRA et al., 2005).

Uma das formas de se melhorar a fermentação ruminal, modificando-a e potencializando o aproveitamento dos alimentos, além de reduzir o efeito negativo da eliminação de gases de efeito estufa desses animais para o meio ambiente é por meio da utilização de aditivos alimentares. É crescente o número de estudos buscando aditivos alimentares alternativos, principalmente aqueles que não acometam em restrição dos consumidores (SELEM, 2012), por isso o estudo da utilização da própolis na alimentação de ruminantes vem se destacando (OLIVEIRA, 2006). Acredita-se que o uso da própolis é mais seguro e menos tóxico do que remédios sintéticos (CASTALDO & CAPASSO, 2002).

A ação da própolis sobre o metabolismo ruminal se dá de forma a reduzir a quantidade de bactérias gram-positivas, que são as principais digestoras da fração fibrosa, e tem elevada ação específica na produção de amônia, metano, acetato e CO<sub>2</sub> no rúmen (SIMIONE, 2011), sendo esta a principal perda de energia do metabolismo ruminal (FREITAS, 2009).

Uma nova própolis brasileira, ainda pouco estudada, vem demonstrando, em ensaios *in vitro*, atividades antimicrobiana e antioxidante. Ela foi classificada como o 13º tipo de própolis brasileira (CABRAL, 2008) e tem se destacado não só por sua coloração e origem botânica diferenciada, mas também por sua composição química, com compostos até então inéditos em outras própolis brasileiras, como isoflavonóides de alta atividade antioxidante (CABRAL, 2008).

Essa própolis, conhecida popularmente como “própolis vermelha” (ALENCAR et al., 2007), recentemente recebeu o selo de indicação geográfica e passou a ser chamada de Própolis Vermelha dos Manguezais de Alagoas (PVA) (SANTA RITA et al., 2013).

Este trabalho teve como objetivo estudar o efeito do extrato de Própolis Vermelha de Alagoas sobre a fermentação ruminal *in vitro* de dietas com diferentes proporções de volumoso:concentrado.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de digestibilidade *in vitro* foi realizado no laboratório de Nutrição Animal (LANA) da Universidade Estadual de São Paulo, no Campus Jaboticabal.

### 2.1 Extrato etanólico de própolis

A Própolis Vermelha de Alagoas foi proveniente de colmeias de abelhas *Apis mellífera* localizadas do município de Marechal Deodoro – AL.

Foram utilizados extratos etanólicos nas concentrações de 20, 40 e 60% de própolis. As concentrações testadas foram escolhidas baseado em trabalhos testando outros tipos de própolis (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004). Para a preparação dos extratos de PVA, a própolis foi moída em moinho tipo bola, pesada e colocada em tubos falcon. A pesagem foi feita de acordo com a concentração desejada, tendo o volume completado até 10 mL de álcool etílico, diluído a 70%. Posteriormente os tubos foram envolvidos com papel escuro para evitar entrada de luz, e agitados em agitador tipo Vortex por 20 segundos. Os tubos foram agitados duas vezes ao dia durante 10 dias, quando os extratos foram filtrados em papel filtro, e colocados em frascos de vidro âmbar.

### 2.2 Dietas

Foram utilizadas duas dietas com 70:30 e 50:50 de relação volumoso: concentrado. O volumoso constou de capim tifton e o concentrado foi composto por farelos de milho e soja.

As dietas foram analisadas quanto aos percentuais em matéria seca (MS), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), segundo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

Na Tabela 2 estão contidos os percentuais bromatológicos dos ingredientes das dietas, e na tabela 3, estão contidos os percentuais dos ingredientes de cada dieta.

Tabela 2: Composição bromatológica dos ingredientes e das dietas (% na matéria seca)

INGREDIENTE E DIETA	MS	MM	PB	EE	FDN	CHOT	CNF
<b>CAPIM TIFTON</b>	85,91	14,51	11,82	1,61	63,00	72,06	9,06
<b>MILHO</b>	87,29	3,10	13,79	4,88	9,72	78,23	19,38
<b>SOJA</b>	87,50	12,87	47,38	1,19	19,19	38,56	68,51
<b>DIETA 70:30</b>	86,34	11,82	14,93	2,14	47,72	70,93	15,84
<b>DIETA 50:50</b>	86,62	10,03	17,01	2,78	37,54	70,18	20,36

MS- matéria seca; MM- matéria mineral; PB- proteína bruta; EE- extrato etéreo; FDN- fibra em detergente neutro; CHOT- carboidratos totais; CNF- carboidratos não fibrosos

Tabela 3: Composição percentual dos ingredientes, com base na matéria seca

INGREDIENTE	DIETAS	
	70:30	50:50
<b>CAPIM TIFTON</b>	<b>70,00</b>	<b>50,00</b>
<b>MILHO</b>	<b>22,50</b>	<b>37,50</b>
<b>SOJA</b>	<b>7,50</b>	<b>12,50</b>

### 2.3 Tratamentos

A formação dos tratamentos foi feita conforme a Tabela 4.

Tabela 4: Formação dos tratamentos de acordo com a dieta (relação volumoso:concentrado) e concentração de Extrato etanoico de Própolis Vermelha de Alagoas (%)

Dieta (Relação volumoso:concentrado)	Concentração de Extrato etanoico de Própolis Vermelha de Alagoas (%)
70:30	0
	20
	40
	60
50:50	0
	20
	40
	60

### 2.4 Estudo *in vitro*

A cinética ruminal foi estimada pela técnica de produção de gás *in vitro*, usando a metodologia descrita por Theodorou et al. (1994) e modificada por Mauricio et al. (1999).

O meio de cultura foi preparado um dia antes da inoculação e foi mantido em banho-maria a 39°C. No dia da incubação foi adicionada a esse meio uma solução

contendo NaOH, sulfito de sódio e cisteína HCl, que foram mantidos sob saturação constante de CO<sub>2</sub> até adição do inóculo. Para a obtenção do inóculo, foi utilizado um bovino macho castrado, fistulados no rúmen e submetido a uma dieta a base de tifton e concentrado.

A coleta do inóculo foi realizada com o animal em jejum. O inóculo coletado foi submetido a filtragem em tecido tipo gaze e mantido em temperatura de 39°C e depois misturado ao meio de cultura e solução tampão de McDougall (1948), com saturação de CO<sub>2</sub> durante todo processo de preparação da solução.

Para a medida de produção de gás, 0,2g das diferentes dietas foram colocadas em sete garrafas de vidro com capacidade para 110 ml, foram adicionados 30 ml da mistura, composta por 8 ml de inóculo ruminal e 24 ml de solução tampão (McDOUGALL, 1948), para os tratamentos com própolis foram adicionados 0,6 ml de extrato etanólico de própolis, para os tratamentos controle foram colocados 0,6 ml do álcool, do mesmo utilizado para produção do extrato. As garrafas foram seladas com tampa de silicone e envoltório metálico, para evitar a perda de gases, e mantidas em banho-maria por 144 horas, em temperatura constante de 39°C.

As leituras de produção de gás foram feitas nos tempos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 120 e 144 horas após o início da incubação, em sistema semi-automático com transdutor de pressão acoplado a um voltímetro (Gas Production System, ANKON®).

Para estimar os padrões da fermentação microbiana foi adotado o modelo de FRANCE et al. (1993), baseado na média da produção acumulada de gases de cada amostra, dado pela equação:

$$A = Af \times \left\{ 1 - e^{-[b \times (t - t_0) - c \times (\sqrt{t} - \sqrt{t_0})]} \right\}$$

Em que: *A* é o volume acumulado de gases produzidos até o tempo *t*; *Af* é o volume assintótico dos gases produzidos; *b* e *c* são parâmetros do modelo; e *t*<sub>0</sub> representa um tempo de colonização discreto.

Para calcular a taxa de produção fracional de gases foi usado o seguinte modelo:

$$\mu = \frac{b+c}{2 \times \sqrt{t}}$$

Os dados de produção durante as 24h de incubação e de análise bromatológica das dietas foram utilizados para os cálculos de predição dos valores energéticos, segundo as equações preconizadas por Menke & Steingass (1988):

$$\text{DIVMO} = 14,88 + ((0,889 * \text{gás24}) + (0,045 * \text{PB}) + (0,065 * \text{MM}))$$

$$\text{EM (MJ/KgMS)} = 2,20 + (0,136 * \text{gás24}) + (0,0057 * \text{PB}) + (0,00029 * \text{EE}),$$

Onde: EM é a energia metabolizável; gás24 é a produção de gás *in vitro* em 24 h, em ml/0,2 gMS. Os valores de PB e EE foram expressos em g/Kg de MS. Estes valores foram utilizados para o calcular o NDT por meio dos fatores:

$$\text{ED (Mcal/kg de MS)} = \text{EM}/0,82$$

$$\text{NDT} = \text{ED}/4,409 * 100 \text{ (NRC, 2001)}$$

Para conversão da EM de MJ para Mcal foi utilizado o fator:

$$\text{EM (Mcal/KgMS)} = \text{EM (MJ/KgMS)}/4,184$$

O pH e as concentrações em gás metano e CO<sub>2</sub>, e N-NH<sub>3</sub> do material incubado foram analisados com 24 h de incubação.

Os gases foram avaliados no dia da coleta, em cromatógrafo gasoso, utilizando-se como padrões gás metano e gás carbônico, após serem coletados em seringas plásticas vedadas com torneira de três vias.

Para a análise de N-NH<sub>3</sub> as garrafas foram colocadas em gelo, para parar a atividade microbiana. Após o resfriamento das garrafas foram coletados 10 ml do líquido, que posteriormente foram destilados e titulados, seguindo metodologia descrita por Silva & Queiroz (2002).

## 2.4 Estudo estatístico

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente casualizado, com sete repetições, para as análises de pH, nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>), metano (CH<sub>4</sub>) e gás carbônico (CO<sub>2</sub>).

Para cinética de produção de gás foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado com arranjos distribuídos em parcela subdividida, com 2 dietas e 4 níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis.

Para comparação das médias de produção de gases, pH, N-NH<sub>3</sub>, CH<sub>4</sub> e CO<sub>2</sub> foram utilizados os testes de Tukey e F - Snedecor e os dados submetidos a análise utilizando o software de análise estatística R development Core Team (2013).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores referentes aos parâmetros de produção de gás obtidos utilizando o modelo de France,  $PG \sim A * (1 - \exp(-B * (\text{Tempo} - L) - C * (\text{sqrt}(\text{Tempo}) - L^{1/2})))$ , em que: PG = produção de gás em função de A = potencial máximo de produção de gases, L = tempo de colonização, e B e C = taxas fracionais constantes, estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5: Comparação dos parâmetros do modelo de produção de gás em função da dieta e concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP)

Parâmetros	DIETAS							
	70:30				50:50			
	CONCENTRAÇÕES DE EEP				CONCENTRAÇÕES DE EEP			
	0	20	40	60	0	20	40	60
A (mL/gMS)	67,10a	21,33b	22,16b	22,98b	85,42a	20,33b	19,72b	18,67b
L(h)	1,08a	1,34a	0,96a	1,11a	0,18a	0,68a	0,38a	6,46a
B	0,01	0,34	0,08	0,28	0,02	0,09	0,14	0,51
C	0,13	0,34	0,47	0,24	0,02	0,40	0,24	0,85
R <sup>2</sup>	0,99	0,97	0,98	0,98	0,93	0,96	0,89	0,95
Erro	0,27	1,02	0,62	0,17	0,77	0,41	0,63	0,42
DIVMO (%)	50,42a	34,39b	32,83b	34,93b	45,05a	35,00b	36,20b	37,49b
EM (Mcal/KgMS)	1,79a	1,21b	1,15b	1,23b	1,60a	1,23b	1,28b	1,32b
ED (Mcal/KgMS)	2,19a	1,47b	1,40b	1,50b	1,95a	1,50b	1,56b	1,61b
NDT	49,60a	33,39b	31,81b	33,93b	44,27a	34,11b	35,32b	36,62b

A= Potencial máximo de produção de gás (ml/gMS), L=Tempo de colonização, B e C= parâmetros do modelo; DIVMO= digestibilidade in vitro da matéria orgânica, EM= energia metabolizada, ED= energia digestível, NDT=Nutrientes digestível total. Médias seguidas de letras diferentes nas linhas indicam que o tratamento foi diferente do grupo controle pelo teste F- Snedecor (P< 0,05)

Os maiores valores de potencial máximo de produções de gás (A), 67, 10 mL/gMS e 85,42 mL/gMS, foram encontrados nos tratamentos que não receberam própolis, nas duas dietas estudadas. A inclusão da própolis reduziu drasticamente o potencial de produção de gás das dietas, que passou a se manter na faixa dos 20 mL/gMS, independentemente do nível de inclusão e da dieta (P>0,05).

O tempo de colonização microbiana (L), que representa o período entre a incubação do substrato e o início da atividade microbiana, não apresentou diferença estatística, quando foram comparadas as diferentes inclusões de extrato de própolis com às dietas controle. Isso mostra que não houve, inicialmente, compostos que inibissem a atividade dos microrganismos ruminais sobre os tratamentos avaliados, havendo quantidade de alimentos potencialmente fermentáveis em todos os tratamentos.

Os valores de DIVMO foram baixos e variaram entre 32,83 e 50,42%, sendo os maiores valores de digestibilidade de 50,42 e 45,05% das dietas controle 70:30 e

50:50 respectivamente. Contrariamente, Prado et al. (2010), testando produtos à base de própolis marrom, observaram que a digestibilidade *in vivo* das dietas que receberam própolis foram superiores ao do tratamento controle (sem utilização de própolis) e ao tratamento com monensina na alimentação de bubalinos.

O NDT apresentou resposta semelhante a DIVMO, com os menores valores dessa variável influenciados pela presença do extrato de própolis. Independente da dieta, todos os tratamentos com própolis tiveram valores menores que os tratamentos controle. Esse comportamento também foi observado por Prado et al. (2010b), que ao avaliarem dois produtos comerciais à base de própolis marrom, em bovinos, perceberam que esses tratamentos tiveram redução no NDT quando comparados ao tratamento controle. No presente experimento, parte dos nutrientes pode não ter tido tempo suficiente de ser digerido pelos microrganismos, uma vez que, as dietas que continham própolis tiveram a atividade microbiana paralisada com menos de 24 horas de incubação.

Não houve diferença estatística ( $P > 0,05$ ) quanto aos valores de amônia, sendo o menor valor encontrado de 14 mg/100mL (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de pH e amônia das dietas com diferentes extratos etanoicos de própolis vermelha de Alagoas

DIETAS	pH				Amônia (mg/100mL)			
	0	20	40	60	0	20	40	60
<b>70:30</b>	6,99Ba	7,27Bb	7,28Bb	7,28Bb	15,93	15,15	14,29	14,55
<b>50:50</b>	7,03Aa	7,35Ab	7,35Ab	7,37Ab	18,55	15,25	14,95	14,00

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ )

O pH dos tratamentos sofreu influência significativa ( $P < 0,05$ ) tanto da dieta quanto da concentração de extrato de própolis utilizada (Tabela 6). Houve efeito da inclusão de extrato de própolis sobre o pH ( $P < 0,05$ ), quando comparados com os tratamentos controle. Stradiotti Júnior et al. (2004), quando avaliaram a utilização de extrato de própolis *in vitro*, também perceberam aumento no pH dos tratamentos que receberam extrato de própolis. Morsy et al. (2010), ao avaliarem esse parâmetro, de três níveis de concentrações (0, 125, 250 e 500  $\mu\text{g/g MS}$ ) de extrato purificado de própolis brasileira e do Egito observaram diferença significativa quanto a esse parâmetro apenas para o tratamento da própolis do Egito de maior nível de própolis (500  $\mu\text{g/g MS}$ ).

Surpreendentemente, entre os tratamentos controle, a maior média de pH foi da dieta com relação de 50:50 de volumoso:concentrado. Segundo Costa et al. (2005), dietas com maiores teores de concentrados podem reduzir os valores de pH ruminal, comprometendo a digestibilidade da fibra. O aumento do pH pode afetar a relação acetato: propionato, pois as bactérias formadoras de acetato são favorecidas em pH elevado (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004). Contudo, apesar da diferença estatística, os valores de pH observados não comprometem a eficiência de síntese microbiana e a digestibilidade ruminal, que segundo Hoover (1986) pode ocorrer quando o pH for inferior a 6,2.

Por outro lado, o pH ruminal sofre variação, influenciada pelo tempo após a ingestão dos alimentos pelos animais, e em estudos *in vitro* o comportamento do valor de pH tem contrariado o padrão normal do retículo rúmen (GONÇALVES et al., 2001).

Segundo Sapaterro (2013), uma das propriedades que a própolis exerce sobre o meio ruminal é a capacidade de diminuir a digestão de proteína no rúmen e disponibiliza-la para digestão intestinal. No entanto, segundo Satter & Slyte (1974) são necessários no mínimo 5 ml/dL de N-NH<sub>3</sub> no fluido ruminal para que ocorra a síntese de proteína microbiana no rúmen, logo, não houve interferência da atuação da própolis sobre o ajuste de amônia no líquido ruminal.

Morsy et al. (2010) também não observaram diferença significativa ao avaliarem três níveis de extrato de própolis purificada (0, 125, 250 e 500 µg/g MS) de própolis, provenientes do Brasil e do Egito, na produção de amônia, pela metodologia de produção de gás *in vitro*.

A produção de CO<sub>2</sub> foi influenciada tanto pela dieta, quanto pela concentração de extrato de própolis (P<0,05). Os tratamentos que receberam extrato de própolis tiveram redução da produção de CO<sub>2</sub> quando comparados ao controle, independente da relação volumoso:concentrado. Por outro lado, tratamento controle da dieta com relação de 50:50 de volumoso:concentrado apresentou maior produção de CO<sub>2</sub> quando comparado ao tratamento controle da dieta 70:30 de volumoso:concentrado (Tabela 7).

Tabela 7: Análise de variância do CO<sub>2</sub> e metano das dietas com diferentes extratos etanoicos de própolis vermelha de Alagoas

Dietas	CO <sub>2</sub> (mmol/mol)				METANO (mmol/mol)			
	0	20	40	60	0	20	40	60
<b>70:30</b>	49,11Ab	18,96Aa	31,71Aab	35,36Ab	14,98b	1,96a	2,06a	2,13a
<b>50:50</b>	80,67Bb	33,51Aa	28,08Aa	24,02Aa	20,47b	2,05a	2,07a	2,38a

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,05)

Segundo Khazaal et al. (1995), a redução do CO<sub>2</sub>, observada pela técnica *in vitro* de produção de gás, pode resultar na redução do total de gases produzidos, No presente experimento houve menor produção do total de gases nas dietas com inclusão de própolis, como pode ser observado na Figura 3.

Pode ter havido uma alteração nas concentrações de AGCC no meio ruminal, havendo maior utilização do carbono disponível, e diminuindo a formação de CO<sub>2</sub>, pois, segundo Stradiotti Júnior et al. (2004), essa resina tem a propriedade de “conservar carbono” no meio ruminal, e utilizar hidrogênio para aumentar as concentrações de ácido propiônico (3 carbonos) reduzindo a concentração de ácido acético (2 carbonos). Essa propriedade da própolis é a responsável pela redução de formação de metano a nível ruminal, já que há uma relação inversa entre o aumento da formação de propionato com a redução de metano produzido.

Houve redução da produção de metano (P<0,05) com a inclusão de extrato de própolis nas dietas controle. A redução do metano pode estar relacionada a uma inibição da fermentação em função das concentrações de própolis vermelha utilizada, já demonstrada na redução do potencial de produção de gás, predito pela equação de France e demonstrada na Figura 3. Até um terço dos gases produzidos pela fermentação dos carboidratos, a nível ruminal, pode ser metano (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004). Por outro lado, a redução da concentração de metano no total de gases produzidos pode significar uma possível utilização de própolis para se obter melhores resultados na conversão alimentar dos ruminantes, aumentando o conteúdo de energia líquida dos alimentos (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).

Selem (2012) ao avaliar o efeito de três concentrações (25, 50 e 100 µg/g MS) de própolis vermelha purificada do Brasil e própolis marrom do Egito sobre a produção de metano *in vitro* constatou redução de produção de metano, quando comparou o nível de 50 µg/g MS de própolis vermelha com o controle e resposta semelhante quando comparada à monensina.

Morsy et al. (2010), avaliaram três níveis de concentrações (0, 125, 250 e 500  $\mu\text{g/g}$  MS) de extrato de própolis purificada, brasileira e do Egito, e perceberam que as duas própolis foram eficientes na redução de metano *in vitro*, sem que houvesse efeitos negativos na digestibilidade.

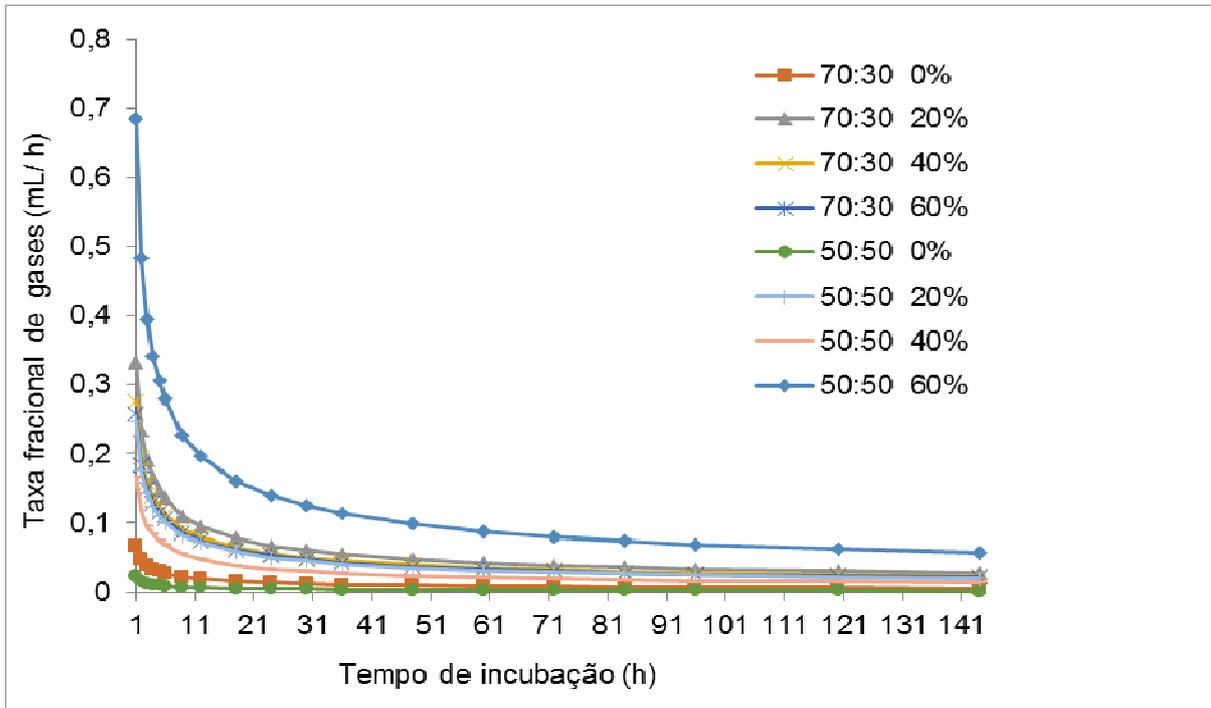


Figura 1: Taxa fracional de produção de gases, das diferentes dietas com três concentração de extrato etanoico de própolis vermelha de Alagoas

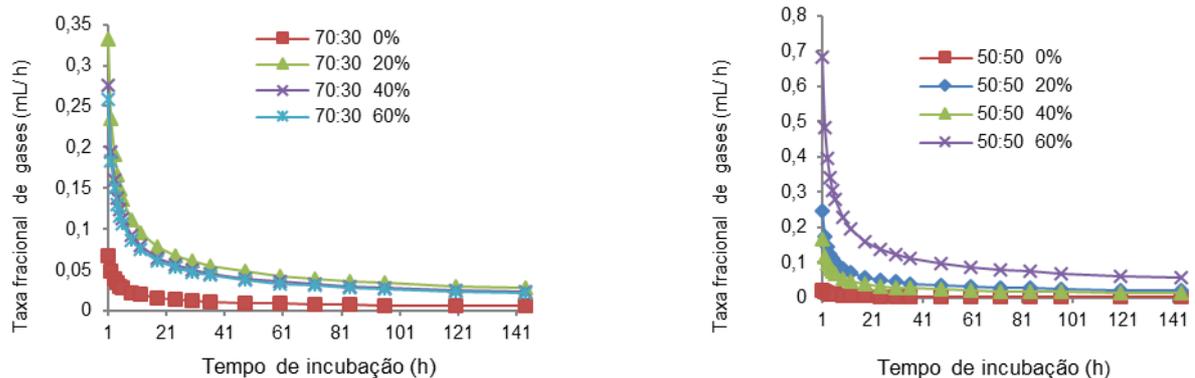


Figura 2: Taxa fracional de produção de gases, das diferentes dietas com três extratos etanoicos de própolis vermelha de Alagoas

Segundo Wascheck et al. (1999), a taxa fracional de produção de gás mostra os tratamentos que apresentam menor tempo para fermentação da porção potencialmente fermentável existente no alimento. Nas dietas 70:30, as maiores taxas fracionais de produção de gás foram das dietas com inclusão de extrato de

própolis. Todos nos níveis de extrato ficaram bem próximas, menos a dieta controle, que obteve a menor taxa fracional de produção de gás. Na dieta 50:50, a maior taxa fracional de produção de gás foi o tratamento com 60% de inclusão de extrato de própolis, o que denota que apesar de possuir maiores teores de alimentos concentrados que a dieta 70:30, a alta concentração de extrato de própolis diminuiu a capacidade fermentativa desse tratamento.

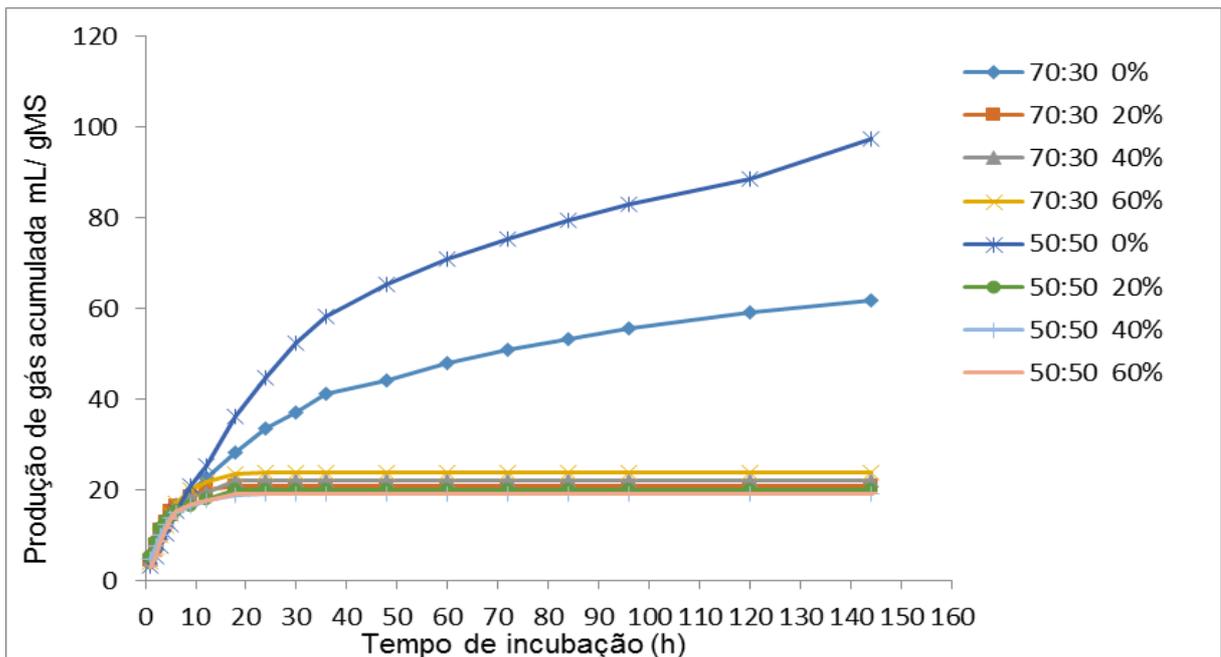


Figura 3: Produção acumulada de gás (mL/gMS) de diferentes dietas contendo diferentes níveis de extrato etanoico de própolis vermelha de Alagoas

Stradiotti Júnior et al. (2004), quando avaliaram níveis crescentes de inclusão de extrato de própolis (0; 16,7; 33,3; e 66,7%), em dietas contendo apenas volumoso, volumoso+concentrado e apenas concentrado, também perceberam que houve redução na produção de gás. As maiores reduções foram para os tratamentos que continham maiores níveis de extrato de própolis, isso pode ser devido a propriedade que a própolis exerce sobre o funcionamento ruminal, atuando sobre as bactérias celulolíticas e produtoras de formato, reduzindo sua população, e acetato, inibindo ou erradicando sua população.

Teoricamente, isso poderia ser explicado pela propriedade que a própolis tem em reduzir a produção de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ , fato que foi observado no experimento (Tabela 6).

A escolha das concentrações dos extratos de própolis foi baseada em estudo como o de Stradiotti Júnior et al. (2004), que avaliaram o extrato de própolis

marrom nas concentrações de 0; 16,7; 33,3; e 66,7%, e obtiveram resultados positivos nos parâmetros ruminais analisados, para todas as concentrações do extrato.

Contudo, os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que a Própolis Vermelha de Alagoas possui ação inibidora da microflora a concentrações baixas, uma vez que o potencial de produção de gás foi muito inferior a dieta controle, já a partir da utilização do extrato com concentração de 20% de própolis. Todas as concentrações de extrato de própolis vermelha de Alagoas paralisaram a produção de gases com aproximadamente 24 horas de incubação (Figura 3). Esse resultado, possivelmente, pode ser devido a composição diferenciada dessa própolis, rica em isoflavonóides de alto poder antibiótico, o que pode ter causado, nas concentrações utilizadas, a lise celular dos microrganismos ruminais.

#### 4 CONCLUSÃO

O extrato de Própolis Vermelha de Alagoas como aditivo na alimentação de ruminantes não pode ter sua concentração baseada na concentração do extrato de própolis marrom, uma vez que a menor concentração utilizada (20%) causou drástica redução da fermentação ruminal.

A Própolis Vermelha de Alagoas apresentou forte ação sobre os microrganismos ruminais no estudo *in vitro*, sua atuação pode estar ligada aos isoflavonóides existentes nessa própolis.

São necessários mais trabalhos que estudem menores concentrações do extrato de Própolis Vermelha de Alagoas *in vitro*, para encontrar a concentração que atue de forma positiva na redução da produção de metano e CO<sub>2</sub> ruminal, sem causar morte dos microrganismos existentes no rúmen.

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S. R.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian própolis: Red própolis. **Jornal of Ethnopharmacology**. Lausanne, v. 113, n.2, p.278- 283, 2007.
- CASTALDO, S.; CAPASSO, S. Própolis, na old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, São Paulo, V. 73, Suppl. 1, 2002.
- FAVORETO, M. G.; DERESZ, F.; FERNANDES, A. M., VIEIRA, R. A. M; FONTES, C. A. de A. Avaliação nutricional da grama-estrela cv. Africana para vacas leiteiras em condições de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. vol.37, n.2 2008.
- GONCALVES ET AL.; A.L. GONCALVES; R.P. LANA; M.T. RODRIGUES; R.A.M. VIERA; A.C. QUEIROZ; D.S. HENRIQUE. Nictemeral pattern of ruminal pH and feeding behavior of dairy goats fed diets with different roughage to concentrate ratio **Revista Brasileira de Zootecnia**. 30p. 1886–1892. 2001.
- KHAZAAL, K.; DENTINHO, M. T.; RIBEIRO, J. M.; ØRSKOV, E. R., Prediction of apparent digestibility and voluntary intake of hays fed to sheep: comparison between using fibre components, in vitro digestibility or characteristics of gas production or nylon bag degradation. **Animal Science**, 61 (3): 527-538, 1995.
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K. S.; THEODOROU, M. K. A semiautomated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, n.4, p.321-330, 1999.
- McDOUGALL, E. I. Studies on Ruminant Saliva. **Biochemical Journal**. v. 43, n.1, p. 99-109, 1948.
- MORSY, A. S.; SOLTAN, Y. A. ; SALLAM, S. M. A. ; ARAÚJO, R. C. ; ALENCAR, S. M. ; ABDALLA, A. Efeito do extrato de própolis sobre a fermentação ruminal e

produção de metano in vitro. In: 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010, Salvador - BA. **Anais...** 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. v. 1. p. 1-3. 2010.

OLIVEIRA J. S.; QUEIROZ A. C.; LANA R. P.; MANTOVANI H. C.; GENEROSO R. A. R. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. **Rev. Bras. Zootecnia**. 35 (1) p. 275–281, 2006.

PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T.; PRIMAVESI, O. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**, [S.l.], Mai. 2005.

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P.; FRANCO, S.L.; PRADO, I.N.; JACOBI, G. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 39:2055-2065. 2010a.

PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. et al. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1336-1345, 2010b.

RIBAS, M. N.; GONÇALVES, L. C.; MAURÍCIO, R. Degradabilidade e cinética de fermentação ruminal das silagens de quatro híbridos de milho, avaliadas pela técnica in vitro semi-automática de produção de gases. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.6, n.2, p.223-233, 2007.

R development Core Team. **R**: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. Disponível em: <http://www.R-project.org/>.

SANTA RITA, L.P.; TONHOLO, J.; SÁ, E.M.de O.; UCHOA, S.B.B.; SILVA, P.B.B. da S.; ALBUQUERQUE, P.P.; BENTES, A. **Indicação geográfica da Própolis Vermelha de Alagoas: antecedentes e apropriabilidade em um sistema setorial de inovação.** Disponível na web em: [http://www.altec2013.org/programe\\_mme\\_pdf/127.pdf](http://www.altec2013.org/programe_mme_pdf/127.pdf). Acesso em: abril 2014.

SAPATERRO, G. A. **Resíduo da extração da própolis como aditivo na dieta de ovinos fistulados.** 2013. Dissertação de Mestrado UFMS – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. 2013.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, n. 32,p194-208, 1974.

SELEM, A.S.M.A. **Effect of propolis on ruminal fermentation, reproductive and productive performance of Santa Inês ewes.** 2010. Tese de Doutorado. USP – Universidade de São Paulo. 221 p. 2010.

STRADIOTTI JR., D.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. P.; PACHECO, C. G.; EIFERT, E. C.; NUNES, P. M. M. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004.

SILVA, D. J., QUEIROZ A. C. **Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos.** 2 ed. Viçosa: *UFV*. 166p. 2002.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S. MCALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetic of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.48, n.2, p.185-197, 1994.

THORPE A. Enteric fermentation and ruminant eructation: the role (and control?) of methane in the climate change debate. **Climatic change**. 93:407431. 2009.

WASCHECK, R. C.; REZENDE, P. L. DE P.; MOREIRA, P. C.; REIS, R. B.; ROSA, S. R. A. DA; MENDONÇA, A. C. Degradabilidade e produção de gases in vitro de fontes energéticas alternativas na alimentação de ruminantes. ***Acta Scientiarum. Animal Sciences*** (Maringá), v. 32, n. 4, p. 425-430, 2010.