

Adição de própolis ou monensina sódica sobre digestibilidade *in vitro* da matéria seca

Addition of propolis or monensin sodium on dry matter in vitro digestibility

PRADO, Odímári Pricila Pires do^{1*}, ZEOULA, Lúcia Maria¹, PONTARA, Lucimar Peres de Moura¹, FRANCO, Selma Lucy², NOVELLO, Cláudio Roberto², GERON, Luiz Juliano Valério³

¹Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Zootecnia, Maringá, Paraná, Brasil.

²Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Maringá, Paraná, Brasil.

³Universidade Estadual do Mato Grosso, Campus Pontes e Lacerda, Departamento de Zootecnia, Pontes e Lacerda, Mato Grosso, Brasil.

*Endereço para correspondência: odimari@hotmail.com

RESUMO

Avaliou-se o produto patenteado LLOS, à base de própolis, em quatro concentrações de própolis (A, B, C e D, em que A é menos concentrada e D é a mais concentrada) e três teores alcoólicos (1, 2 e 3, em que 1 foi menos concentrado e 3 é o mais concentrado), monensina sódica e controle (sem aditivo), sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca de dietas com 50% de volumoso (Feno de Estrela) e 50% de concentrado e 100% volumoso (Feno de Tifton). Foi utilizada técnica de digestibilidade *in vitro* da matéria seca de um estágio. Foi utilizado o sistema STATISTICA, no procedimento GLM. Foram utilizados testes de contraste a 5% e teste de Tukey a 5%. Os maiores coeficientes de digestibilidade *in vitro* da matéria seca das dietas com 50:50% de volumoso:concentrado foram para as seguintes combinações do produto LLOS: concentração C em álcool 1 (LLOSC1; 57,37%), concentração D em álcool 1 (LLOSD1; 56,41%), concentração A em álcool 2 (LLOSA2; 56,03%) e concentração C em álcool 3 (LLOSC3; 56,04%). Os maiores coeficientes de DIVMS com 100% de Feno de Tifton foram para os produtos LLOS: concentração B em álcool 3 (LLOSB3; 49,09%) e concentração C em álcool 1 (LLOSC1; 45,49%). Para as rações com 50% ou 100% de volumoso, observaram-se valores superiores ou semelhantes às dietas monensina e controle. A liberação da substância ativa atuante no aumento de valores da digestibilidade *in vitro* da matéria seca não é diretamente proporcional ao aumento da concentração de própolis e teor alcoólico e é mais atuante em combinações com teor médio de flavonoides totais em crisina.

Palavras-chave: dieta concentrada, dieta volumosa, extrato de própolis seco, fermentação ruminal, flavonoide, ionóforo

SUMMARY

The objective was to evaluate the LLOS products, based in propolis, in four propolis concentrations (A, B, C and D – A is less concentrated and D is the most concentrated) and three alcohol levels (1, 2 and 3 – 1 is less concentrated and 3 in the most concentrated), sodium monensina and control diet (without additive) on dry matter in vitro digestibility (DMIVD) in diets with 50% roughage (Star's hay), 50% concentrated and 100% concentrated (Tifton's hay). It was used the technique of dry matter in vitro digestibility of one stage. For statistical analysis, STATISTICA system was used in the GLM procedure. Tests were used to contrast the 5% and Tukey's test at 5%. The highest rates of dry matter in vitro digestibility of treatments with 50:50% of roughage:concentrate were for the following combinations of LLOS products: concentration C in alcohol 1 (LLOSC1; 57.37%), concentration D in alcohol 1 (LLOSD1; 56.41%), concentration A in alcohol 2 (LLOSA2; 56.03%) and concentration C in alcohol 3 (LLOSC3; 56.04%). The highest rates of dry matter in vitro digestibility with 100% of Tifton's hay were for LLOS products: concentration B in alcohol 3 (LLOSB3; 49.09%), concentration C in alcohol 1 (LLOSC1; 45.49%) and concentration C in alcohol 2 (LLOSC2; 41.50%). For diets with 50% or 100% roughage, it were observed higher values or similar to control and monensin treatments. The release of the active substance in increasing dry matter in vitro digestibility values is not directly proportional to the concentration of propolis and alcohol, being more active in combination with a middle content of total flavonoids in chrysin.

Keywords: concentrated diet, flavonoid, ionophore, roughage diet, propolis extract powder, ruminal fermentation

INTRODUÇÃO

Para que ocorra manipulação dos produtos finais da fermentação ruminal, é necessário alterar a população de microrganismos ruminais, de forma que forneça os ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato). Os ionóforos são utilizados para seleção das bactérias produtoras de propionato, em detrimento das produtoras de H₂, acetato e metano (MORAIS et al., 2006).

Os ionóforos na dieta de ruminantes proporcionam melhor utilização da energia metabólica e diminuição na concentração de lactato e na desaminação proteica (SPEARS, 1990). A melhora da energia metabólica de dietas com ionóforos está associada à redução da metanogênese, que acarreta perdas de até 13% em relação à energia do alimento ingerido (LANA et al. 1998). Porém, a utilização de ionóforos não é mais permitida na União Europeia (EUROPEAN UNION, 1998).

Assim, a própolis tem sido estudada como alternativa natural aos ionóforos utilizados na alimentação de ruminantes, pois possui inúmeras substâncias ativas em sua composição. Destacam-se os flavonóides, que apresentam ação bacteriostática e bactericida (ALENCAR et al., 2007).

Em experimento *in vitro* realizado por Broudiscou et al. (2000), foi observado que a própolis aumentou a produção de propionato em 10,3% e diminuiu a população de protozoários. Também, Rísoli et al. (2009) observaram que o extrato de própolis LLOSC1 reduziu os protistas ciliados do rúmen de bubalinos alimentados com dieta 50:50% (volumoso: concentrado).

Em experimento *in vitro*, ao testar o efeito do extrato de própolis líquido (30% de própolis em álcool 70°) sobre a fermentação de aminoácidos por

microrganismos ruminais, Oliveira et al. (2006) observaram que a própolis foi mais eficiente em diminuir a produção de amônia que a monensina.

Como a composição química da própolis varia de acordo com a flora apícola existente na região, torna-se necessário buscar ferramentas para padronizar a preparação dos extratos à base de própolis (IANNUZZI, 1993). Portanto, é importante avaliar os teores alcoólicos e concentrações de própolis que constituem o extrato a ser utilizado em ruminantes.

Dessa forma, objetivou-se avaliar doze extratos de própolis secos (pó) LLOS (produto patenteado) constituídos de quatro concentrações de própolis (A, B, C, D) e três teores alcoólicos (1, 2 e 3), além da dieta monensina sódica e controle (sem aditivo) sobre a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), em dietas com 50:50% e 100:0% volumoso:concentrado em bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal, no Laboratório de Farmacotécnica, e Setores de Bovinocultura de Corte e Apicultura da Fazenda Experimental de Iguatemi, pertencentes à Universidade Estadual de Maringá.

As amostras de própolis foram coletadas em colmeias da Fazenda experimental de Iguatemi. Os teores de chumbo e cádmio na própolis foram analisados através de absorção atômica.

A própolis bruta não apresentou contaminação com metais pesados, mensurados com os teores de cádmio e chumbo em sua composição (Tabela 1).

A própolis apresentou teores elevados de extrato etéreo (26,75%) em razão do

seu conteúdo de ceras, de Ca com 0,28%, de P com 0,26% e de energia bruta com 7,65 Mcal/Kg (Tabela 1). Ressalta-se que a própolis analisada

estava no estado bruto, e os teores desses mesmos nutrientes podem ser diferentes nos produtos patenteados LLOS.

Tabela 1. Composição química da própolis bruta em percentagem de matéria seca

Alimento	MS	Composição (% MS)								
		PB	EE	MO	MM	EB	Cd	Pb	Ca	P
Própolis bruta	92,97	0,01	26,75	96,48	3,52	7,65	nd	nd	0,28	0,26

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; MO = matéria orgânica; MM = matéria mineral; EB = energia bruta; Cd = cádmio; Pb = chumbo; Ca = cálcio; P = fósforo, nd = não detectado.

Foram obtidos extratos de própolis com álcool etílico diluído entre 50-96° GL em três teores alcoólicos (1, 2 e 3, em que o nível 1 é de menor teor alcoólico e o 3 é de maior teor alcoólico) e quatro concentrações de própolis fixas (A, B, C e D, em que os níveis A são de menor concentração e os D, de maior concentração). Após a extração, os extratos de própolis líquidos foram secos por meio do método de liofilização durante 24 horas. As amostras foram acondicionadas em frascos bem vedados e mantidas sob temperatura inferior a -5°C. Para o preparo das dietas, os extratos secos de própolis foram estabilizados à temperatura ambiente e incorporados em farelo de soja e de milho, de modo que fossem constituídos os diferentes produtos patenteados LLOS, os quais foram utilizados nas incubações *in vitro*.

Assim, foram constituídas 12 (4 concentrações de própolis em 3 extrações alcoólicas) dietas à base de própolis para cada razão volumoso:concentrado a ser testada (50:50 e 100:0). As combinações foram feitas da seguinte forma: concentração de própolis A em álcool 1 (LLOSA1), concentração de própolis B em álcool 1 (LLOSB1), concentração de própolis C em álcool 1 (LLOSC1) e assim sucessivamente. Os produtos LLOS

estão patenteados com patrimônio intelectual sob o nº PI 0605768-3.

Além das dietas à base de própolis, foram testadas as dietas controle (sem a presença de aditivos) e monensina sódica (10 %) em cada razão volumoso:concentrado.

Foram utilizados como doadores de líquido ruminal bovinos Holandeses, portadores de cânula ruminal, com peso vivo médio de 400kg. Os animais foram alimentados conforme a dieta avaliada nos experimentos *in vitro*, em dietas 50:50 (utilizando como forragem feno de estrela; *Cynodon nlemfuensis*) e 100 a base de feno de tifton (*Cynodon spp.*). As dietas foram constituídas de 13,9% e 5,5% de proteína bruta para 50:50% e 100:0% volumoso:concentrado, respectivamente (Tabelas 2 e 3). Para a incubação de dieta 100% de feno de tifton, os animais foram alimentados com dieta 80:20% volumoso:concentrado.

O ensaio de DIVMS foi conduzido de acordo com a técnica de 1 estágio segundo Baumgardt (1962), citado e descrito por Silva & Queiroz (2002).

O líquido ruminal foi coletado no período da manhã, antes da alimentação matinal e acondicionado em garrafa térmica a 39°C e levado ao Laboratório de Nutrição e Alimentação Animal.

Tabela 2. Composição química dos alimentos em porcentagem de matéria seca

Alimentos	MS	Composição (% MS)							
		PB	EE	MO	FDN	FDA	lignina	Ca	P
Milho moído	89,4	9,3	4,93	98,7	24,9	4,6	1,3	0,0	0,5
Farelo de soja	90,4	50,4	2,64	93,2	13	8,2	1,6	0,2	0,6
Feno de estrela	92,8	12,6	0,98	93,8	78	42,1	10,6	0,4	0,5
Monensina sódica	90,3	13,1	4,20	17,4	19,2	12,2	-	-	-

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; MO = matéria orgânica; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; Ca = cálcio; P = fósforo.

Tabela 3. Composição química em porcentagem da matéria seca e composição percentual das rações experimentais

Composição química das rações									
Rações	MS	Composição (%MS)							
		PB	EE	MO	FDN	FDA	Lignina	Ca	P
50% volumoso e 50% concentrado	91,3	13,9	2,7	95,0	50,4	23,6	6,0	0,2	0,5
100% Feno de Tifton	92,0	5,5	1,2	95,9	86,1	46,6	10,7	0,4	0,4

Composição percentual das rações		
Ingredientes	50% volumoso e 50% concentrado	100% de volumoso
Feno de tifton	-	100,00
Feno de estrela	50,00	-
Milho	41,72	-
Farelo de soja	7,28	-
Sal mineral	1,00	-
Total	100,00	100,00

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; MO = matéria orgânica; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; Ca = cálcio; P = fósforo.

O líquido de rúmen foi misturado à saliva artificial, o pH foi ajustado e o líquido ruminal mantido em anaerobiose e temperatura adequada (39°C). Com auxílio de pipetador automático, foram adicionados 50mL de líquido ruminal aos tubos de digestibilidade, os quais continham 1g da dieta a ser testada. Após o preparo, os tubos foram incubados em banho-maria metabólico, com agitação constante, a 39°C. Três tubos com apenas líquido de rúmen + saliva artificial foram incubados em cada avaliação que servia como branco. A dosagem do ionóforo (10% de monensina sódica – Rumensin®)

adicionado aos tubos de ensaio foi proporcional à dosagem recomendada pelo fabricante, de 2g/animal/dia de Rumensin®. Foi considerado como base de cálculo um bovino com peso vivo médio de 400kg e volume ruminal de 60L (15% do peso vivo), assim, proporcionalmente, foram adicionados 1,7mg de ionóforo por 50mL de líquido ruminal utilizado em cada tubo de ensaio incubado.

Após a etapa de incubação, os tubos foram centrifugados a 2000rpm, o sobrenadante foi retirado com uma bomba de sucção, levado para estufa a

105°C por 24h e pesado para a determinação do resíduo. A digestibilidade foi calculada mediante subtração do resíduo do tubo (descontando-se o conteúdo do tubo branco) do total incubado da amostra, e o valor foi expresso em termos percentuais em relação à amostra incubada. Para cada dieta testada, foram feitas seis repetições.

Os teores de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, extrato etéreo e energia bruta, fósforo e cálcio foram determinados segundo AOAC (1980) citados em Silva & Queiroz (2002). As determinações de fibra em detergente neutro e da fibra em detergente ácido foram conduzidas de acordo com Van Soest et al. (1991).

Os dados de DIVMS foram analisados pelo sistema estatístico STATISTICA (STATSOFT, 1999). Foi realizada análise de variância por meio do procedimento GLM em delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial 4 X 3 (4 concentrações de própolis e 3 teores alcoólicos) para cada proporção de volumoso:concentrado testada. Com base no princípio de que

as dietas selecionaram diferentes populações microbianas, analisou-se o efeito dos teores alcoólicos e das concentrações de própolis em cada meio, para se conhecer qual era a influência da concentração de própolis em cada teor alcoólico. Para a escolha das melhores médias de DIVMS das dietas com o mesmo teor alcoólico e das diferentes concentrações do produto LLOS, foi utilizado teste de contraste a 5%. Depois de selecionadas as maiores médias em cada teor de álcool, essas foram comparadas com as dietas ionóforo e controle por meio de análise de variância e teste Tukey a 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve interação entre teor alcoólico e concentração de própolis na DIVMS das dietas testadas nas duas razões volumoso:concentrado 50:50 e 100:0 (Tabela 4). Desse modo, cada combinação de concentração de própolis e teor alcoólico constituiu-se um produto distinto (PRADO, 2005).

Tabela 4. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca de dietas com 50% de volumoso e 50% de concentrado e 100% de volumoso com teores alcoólicos e concentrações de própolis

Álcool	Concentração de própolis				Álcool X concentração de própolis	P	EPM	CV
	A	B	C	D				
50% de volumoso e 50% de concentrado								
1	55,02 ^b	54,37 ^b	57,37 ^a	56,41 ^{ab}	0,0001	0,0001	0,21	5,50
2	56,03 ^a	54,62 ^a	52,60 ^b	52,81 ^b	---	---	---	---
3	54,62 ^{ab}	53,60 ^b	56,04 ^a	53,25 ^b	---	---	---	---
100% de volumoso								
1	38,66 ^b	37,90 ^b	45,49 ^a	37,57 ^b	0,0001	0,0001	0,24	12,25
2	38,32 ^b	40,94 ^{ab}	41,50 ^a	38,06 ^b	---	---	---	---
3	40,37 ^b	49,09 ^a	40,79 ^b	41,76 ^b	---	---	---	---

Letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente pelo teste de Contraste a 5% (a>b). P = probabilidade; EPM = erro padrão da média; CV = coeficiente de variação.

Em dietas com razão 50:50% volumoso:concentrado, o maior coeficiente de *DIVMS* ($P < 0,05$) no teor alcoólico 1, foi obtido na concentração C (LLOSC1) com 57,37%, seguido da concentração D (LLOSD1) com 56,41%, que não diferiu ($P > 0,05$) das demais concentrações (Tabela 4).

Para a extração em álcool 2, observou-se maior coeficiente de *DIVMS* ($P > 0,05$) para as concentrações A (LLOSA2) com 56,03% e B (LLOSB2) com 54,02%. Provavelmente, no teor alcoólico 2, as menores concentrações de própolis liberaram substâncias flavonoídicas que atuaram mais sobre as bactérias Gram positivas. As menores concentrações de própolis apresentaram menor interferência de ceras e resinas, as quais poderiam impedir a liberação das substâncias ativas que atuam sobre a *DIVMS*. É possível que, em menores concentrações de própolis, a substância (ainda não identificada) que melhora a *DIVMS* esteja mais disponível.

Estudos em que foram utilizados teores alcoólicos médios (similares ao álcool 2), como os de Stelzer et al. (2009), que, ao testarem própolis líquida (30% de própolis em álcool 70°), não observaram alteração da digestibilidade, consumo e o desempenho de vacas com produção acima de 20kg de leite/dia. Extratos de própolis verde e marrom (30% de própolis em álcool 70°) também foram testados em ovinos terminados em confinamento, e observou-se que não influenciaram as características de carcaça, os componentes corporais e o rendimento de cortes desses animais (ÍTAVO et al. 2009).

Porém, quando o extrato de própolis líquido (30% de própolis em álcool 70°) foi estudado associado com óleo de soja na alimentação de cabras leiteiras, observou-se redução nos consumos de matéria seca, matéria orgânica e fibra

em detergente neutro (LANA et al. 2005).

O produto LLOSD2 também não obteve o maior valor de *DIVMS* (52,81%), o que está de acordo com Lana et al. (2007) que testaram extrato de própolis líquido (50% de própolis em álcool 70°) e não observaram efeito da própolis sobre o consumo de matéria seca e nutrientes e nem sobre os valores de pH e concentrações de N-NH₃ e AGV.

No teor alcoólico 3, as concentrações de própolis que apresentaram os melhores coeficientes de *DIVMS* foram C (LLOSC3; 56,04%) e A (LLOSA3; 54,62%), para a dieta com 50% de volumoso, as quais não diferiam entre si. Porém, a concentração A não diferiu ($P > 0,05$) das demais concentrações de própolis (Tabela 4).

Dessa forma, os valores de *DIVMS* em dietas 50:50 volumoso:concentrado mostraram que a melhor concentração de própolis e teor alcoólico não estão de acordo com as concentrações de 30% de própolis e teor alcoólico de 70° e 96° utilizadas por Stradiotti et al. (2004) para medir a atividade específica de produção de amônia (AEPA), em que foram obtidos 78% de inibição da AEPA, e Lana et al. (2005), que avaliaram a digestibilidade aparente de nutrientes em cabras, não observaram diferenças.

Para dietas com 100% de volumoso, o maior valor ($P < 0,05$) de *DIVMS* em teor alcoólico 1 foi com a concentração C (LLOSC1) de 45,49% (Tabela 4).

Para o álcool 2, as concentrações que apresentaram o maior valor ($P < 0,05$) de *DIVMS* foram a concentração C com 41,05% (LLOSC2) e B com 40,94% (LLOSB2). A concentração B também não diferiu ($P > 0,05$) dos valores de *DIVMS* das demais concentrações.

Para o álcool 3, constatou-se que a concentração B (LLOSB3) possui concentração de substância marcadora

em crisina média de 0,011 mg de flavonoides em crisina/g de LLOS (Prado, 2005), de modo que foi obtida maior DIVMS (49,09%; $P < 0,05$) que as demais dietas (Tabela 4).

Para razão volumoso:concentrado 50:50, foi observado que a concentração de própolis C em álcool 1 (LLOSC1) apresentou coeficiente de DIVMS superior ($P < 0,05$) às dietas monensina sódica e controle e aumentou a DIVMS em 3,37 unidades percentuais em relação à dieta com monensina e em 4,4 unidades percentuais em relação à controle (Tabela 5).

As dietas com concentração de própolis D em álcool 1 (LLOSD1), concentração de própolis A em álcool 2 (LLOSA2) e concentração de própolis C em álcool 3 (LLOSC3) apresentaram valores de DIVMS superiores ($P < 0,05$) à controle, porém foram semelhantes à adição do ionóforo, em dietas com 50:50 volumoso:concentrado (Tabela 5).

Para as combinações concentração de própolis B em álcool 2 (LLOSB2) e concentração de própolis A em álcool 3 (LLOSA3) os valores de DIVMS não diferiram ($P > 0,05$) da monensina sódica nem da controle.

Tabela 5. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca de dietas 50% volumoso e 50% concentrado e 100% de volumoso das melhores combinações de concentração de própolis e teor alcoólico dos produtos LLOS, monensina sódica e controle (sem aditivo)

Dietas com 50% volumoso e 50% concentrado											
	LLOS C1	LLOS D1	LLOS A2	LLOS B2	LLOS A3	LLOS C3	Monensina	Controle	P	EPM	CV
DIVMS %	57,37 ^a	56,41 ^{ab}	56,02 ^{ab}	54,61 ^{abc}	54,61 ^{abc}	56,04 ^{ab}	54,00 ^{bc}	52,97 ^c	0,01	0,24	5,15
FLAV ¹	0,018	0,031	0,001	0,011	0,002	0,030	-	-			
Dietas com 100% de volumoso											
	LLOS C1	LLOS B2	LLOS C2	LLOS B3	Monensina	Controle	P	EPM	CV		
DIVMS %	45,49 ^a	40,94 ^b	41,51 ^b	49,09 ^a	39,09 ^b	39,30 ^b	0,01	0,30	10,9		
FLAV ¹	0,018	0,011	0,031	0,011	-	-					

Letras diferentes na mesma linha diferem-se estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%. Sigla da combinação entre concentração de própolis (A, B, C e D) com os teores alcoólicos (1, 2 e 3) utilizados no preparo dos produtos LLOS P: probabilidade, EPM: erro padrão da média, CV: coeficiente de variação. FLAV¹: concentrações de flavonóides totais medido em concentrações de crisina (mg/g de produto) por meio de análise química cromatográfica (Cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE) para os produtos LLOS (PRADO, 2005).

Embora a combinação da concentração de própolis C em álcool 1 (LLOSC1) tenha apresentado maior valor de DIVMS, a concentração de flavonoides totais em crisina encontrada por Prado (2005) foi 2,2 vezes menor que a maior concentração de flavonoides totais em crisina observada. Desse modo, essa maior DIVMS pode ser resultado de

melhor extração de um grupo de flavonoides específicos que possibilitem melhor digestibilidade da matéria seca do que as outras combinações.

Em dietas com 100% de volumoso, a concentração de própolis B em álcool 3 (LLOSB3, 49,09%) e a concentração de própolis C em álcool 1 (LLOSC1, 45,49%), apresentaram valores de

DIVMS superiores ($P < 0,05$) em relação às dietas monensina e controle (Tabela 5). O aumento na DIVMS das dietas LLOSC1 e LLOSB3 com 100% de volumoso pode ser devido à liberação de substâncias que selecionariam cepas resistentes de bactérias celulolíticas que, não sem encontrar competição, proliferam-se rapidamente de forma a gerar taxa de degradação do volumoso e uma melhora no coeficiente de DIVMS. Outra possibilidade seria que a própolis poderia diminuir a população de protozoários no meio (BROUDISCOU et al. 2000; RÍSPOLI et al. 2009), sem efeito predatório sobre as bactérias celulolíticas, com melhora da eficiência de fermentação e conseqüentemente da DIVMS.

Outra hipótese seria que as duas situações agiriam ao mesmo tempo, ou seja, com seleção de cepas de bactérias celulolíticas resistentes à própolis, o que já foi relatado por Prado (2008) que isolou cepas bacterianas celulolíticas tolerantes ao produto patenteado LLOS e a diminuição da população de protozoários. Contudo, essas relações microbiológicas têm que ser melhor estudadas para que se chegue a conclusões definitivas.

Os melhores resultados de DIVMS indicam ainda que o menor teor alcoólico utilizado para a extração da própolis pode ser mais eficiente que os teores normalmente utilizados nos experimentos e extratos comerciais (STRADIOTTI et al. 2004; OLIVEIRA et al. 2004; LANA et al. 2005). Stradiotti et al. (2004) avaliaram extratos etanólicos de própolis com dois teores alcoólicos (70° e 96°), observaram que o álcool 70° apresentou uma menor atividade específica de produção de amônia, e esse álcool é considerado pelos autores como superior ao álcool 96°.

Observou-se ainda, que não foi necessário utilizar grande concentração de própolis para obter aumento na DIVMS, visto que a concentração de própolis A em álcool 2 (LLOSA2), mesmo com pequenas concentrações da substância marcadora em crisina (0,001 mg/g de LLOS; Prado, 2005), apresentou DIVMS de 56,02%, semelhante à dieta com monensina.

Portanto, torna-se necessário encontrar qual a concentração que melhor disponibiliza a(s) substância(s) ativa(s) para a manipulação das bactérias ruminais, aspecto que objetivará próximas pesquisas. Esse resultado é interessante do ponto de vista econômico, pois não são necessárias altas concentrações de álcool e própolis para a obtenção do resultado desejado, o que diminui custos e melhora a manipulação farmacotécnica do produto.

Em estudos com substâncias presentes na própolis, Prado (2005) observou que as concentrações da substância marcadora em crisina para as concentrações B e C são medianas 0,011 (LLOSB3) e 0,031 (LLOSC3) e 0,018 (LLOSC1) mg/g de LLOS; (Tabela 5) quando comparadas ao valor das demais concentrações de própolis. Esses valores sugerem que a liberação da substância ativa varia com as diferentes concentrações de própolis e que o flavonoide atuante na melhora da DIVMS é satisfatoriamente extraído nas concentrações medianas da substância marcadora em crisina.

Observou-se que a relação entre a DIVMS e concentração de própolis não foi numericamente proporcional. Isso pode ter ocorrido devido à presença de um grupo de substâncias que atuam melhorando a DIVMS em concentração específica, no entanto, essa substância não atua de forma linear. Ainda devem-se considerar futuros testes de outras

substâncias marcadoras para a quantificação do teor de flavonoides totais, como a quercetina, apigenina, acacetina entre outros, pois provavelmente a substância ativa para a melhora da DIVMS seja mais polar que o marcador crisina empregado por Prado (2005) para quantificar esse parâmetro.

Diante dos resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que a liberação da substância ativa atuante no aumento de valores da DIVMS não é diretamente proporcional ao aumento da concentração de própolis e teor alcoólico e é mais atuante em combinações com teor médio de flavonoides totais em crisina. O menor teor alcoólico propiciou produto com maior valor de DIVMS tanto em dietas 50:50 como 100:0 volumoso:concentrado. Em dietas com 50% volumoso e 50% concentrado, os combinados LLOS que se constituem promissores aditivos naturais são: LLOSC1; LLOSD1; LLOSC3 e LLOSA2. Em dietas com 100% de volumoso, as combinações LLOSB3 e LLOSC1 constituem promissores aditivos naturais para a nutrição de ruminantes.

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 propolis: red propolis. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p.278-283, 2007.

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.

EUROPEAN UNION. **Agriculture Council**. 14 December 1998, press released n°14127, 1998.

IANNUZZI, J. Propolis collects. **American Bee Journal**, n.2, p.104-151, 1993.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; COSTA, C.; ÍTAVO, L.C.V.; MACEDO, F.A.F.; TOMICH, T.R. Características de carcaça, componentes corporais e rendimento de cortes de cordeiros confinados recebendo dieta com própolis ou monensina sódica. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.5, p.898-905, 2009.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; Van AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, n.8, p.2190-2196, 1998.

LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; QUEIROZ, A.C.; RODRIGUES, M.T.; EIFERT, E.C.; MIRANDA, E.N.; ALMEIDA, I.C.C. 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. EIFERT, E.C.; OLIVEIRA, M.V.M.; STRADIOTTI JR, D.; OLIVEIRA, J.S. 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.

MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. Aditivos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. 583p.

OLIVEIRA, J.S.; LANA, R.P.; BORGES, A.C. QUEIROZ, A.C.; ALMEIDA, I.C. 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, J.S.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. MANTOVANI, H.C.; GENEROS, R.A.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.

PRADO, O.P.P. **Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS)**. 2005. 78f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

PRADO, O.P.P. **Própolis e monensina sódica em dietas volumosas sobre a digestibilidade e características ruminais de bovídeos**. 2008. 92f. Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

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**, v.44, n.1, p.92-97, 2009.

STATSOFT Inc. **Statistica for Windows**. Tulsa, 1999.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 2002. 178p.

SPEARS, J.W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v.120, n.3, p.632-638, 1990.

STELZER, F.S.; LANA, R.P.; CAMPOS, J.M.S.; MANCIO, A.B.; PEREIRA, J.C.; LIMA, J.G. Desempenho de vacas leiteiras recebendo concentrado em diferentes níveis, associados ou não a própolis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1381-1389, 2009.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, 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.

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.

Data de recebimento: 30/09/2009

Data de aprovação: 06/08/2010