

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRÓPOLIS EM DIETA À BASE DE FENO DE *Cynodon ssp*  
FORNECIDA PARA BUBALINOS

Autor: João Batista Gonçalves Costa Junior  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lúcia Maria Zeoula  
Coorientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Lucimar Pontara Peres de Moura

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Curso de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Março – 2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação / CIP

Costa Júnior, João Batista Gonçalves

C837p Própolis em dieta a base de feno de *Cynodon ssp* fornecida para bubalinos / João Batista Gonçalves Costa Júnior ; orientação de Lúcia Maria Zeoula ; co-orientação de Lucimar Pontara Peres de Moura. – Maringá: UEM, 2010.

49 fls.; il.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2010.

1. Búfalo. 2. Nutrição animal. 3. Zootecnia. I. Título. II. Zeoula, Lúcia Maria. III. Moura, Lucimar Pontara Peres de.

CDD 636.293

*"Nós seres humanos, estamos na natureza para auxiliar o progresso dos animais, na mesma proporção que os anjos estão para nos auxiliar. Portanto quem chuta ou maltrata um animal é alguém que não aprendeu a amar."*

Francisco Cândido Xavier, "Chico Xavier"

A Deus por me guiar nessa caminhada difícil,  
Sempre sendo paciente com seu filho;

À avó Alice (*in memoriam*),  
Pelo colo e carinho. Muitas saudades.

Aos meus pais: João Batista e Adelina,  
Pelo incentivo, força, confiança,  
E pelos bons conselhos nas horas decisivas.

Aos meus irmãos: Amanda, Kamilla, Lucas e Sara,  
Pelo carinho e amor com o irmão.

Ao meu amigo e companheiro Tiago,  
Mesmo longe, sempre me incentivando nessa caminhada.

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me ajudar e me cuidar em terras desconhecidas;

À Universidade Estadual de Maringá e o Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade e confiança para realizar este trabalho;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucia Maria Zeoula, pelo ensinamento, orientação, profissionalismo, paciência, compreensão e por me confiar este valoroso trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lucimar Pontara Peres de Moura, por me coorientar, sempre sendo solícita as minhas indagações.

Ao Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ivanor Nunes do Prado, pela grande amizade, carinho, ensinamento, incentivo, cuidado, boas conversas e bons conselhos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Selma Lucy Franco, pela parceria e contribuição no trabalho;

A Maribel Velandia Valero, Roman David Castañeda Serrano, Lina Maria Peñuela Siera, mesmo distantes pelo idioma, sempre perto pela amizade. As várias horas juntos em boas conversas e tentativas de me ensinar o espanhol.

À Sabrina Marcantonio Coneglian, pela amizade, carinho, incentivo, bons papos e pelos esclarecimentos das técnicas laboratoriais.

À Thaís Barros Rísoli, pelo bom humor, sempre, pelo ensinamento e experiência e pelas tardes desbravando a fazendinha da UEM, na busca do ninho do quero-quero.

Aos meus companheiros de trabalho, Eduardo Narostegam da Paula, Rafael Barreiros Samensari, Rosana Brusagim, Miriam Nakatsu, André Neves, Marival Gustavo de Oliveira, Nathália Nissimura (Japoronga), Fabiano Simioni, Gabriel Barreiros Samensari, Vinicius Okamura (Pajé), Karoline Stuewe de Mello, Ricardo

Simões, Marcel de Brito e Daiana Betoni Bello, pela grande ajuda e amizade criada durante o experimento. Sem vocês não teria conseguido fazer nada.

À Odimári Pricila Pires do Prado, Ricardo Kazama, Alexandre Leseur dos Santos e Sílvia Cristina de Aguiar, pelo auxílio e socorro nas horas de dúvida.

Ao Altair Diego Sofiati, Maria Del Pilar Rodriguez Rodriguez, Flávia Weiller Daniel e Denis de Souza Calves, pela amizade, gargalhadas e conversas proibidas.

José Carlos da Silva (Zé) e Ezupério Salim da Silva (Zupa) pela enorme colaboração na execução deste trabalho, o café (doce que nem mel) e pelas boas risadas no dia dia da fazendinha da UEM ;

Às técnicas de laboratório, Creuza Azevedo e Cleuza Volpato, pela ajuda nas análises laboratoriais.

Aos meus pais, Adelina e João Batista, por sempre acreditarem em mim, incentivando meus sonhos e me deixando voar, arriscar e desbravar esse mundo.

Aos meus irmãos, Kamilla, Amanda, Lucas e Sara, mesmo distantes sempre estão comigo no meu coração.

À minha irmã de espírito Mariana de Souza Farias, pelos oito anos de amizade, pelos conselhos, cuidado, paciência e bons momentos juntos.

Ao meu companheiro Tiago Vieira, pela amizade, por ser o meu “Porto Seguro”, paciente e saber suportar a distância.

## BIOGRAFIA

João Batista Gonçalves Costa Junior, filho de João Batista Gonçalves Costa e Adelina Mirtes da Silva, nasceu em Alegre – Espírito Santo, no dia 16 de novembro de 1982.

Em outubro de 2007, concluiu o Curso de Zootecnia, pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – RJ.

Em março de 2008, iniciou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, com estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

No mês de março de 2010, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação de Mestrado.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO .....	11
LITERATURA CITADA .....	18
OBJETIVOS GERAIS .....	22
CAPÍTULO II – Digestibilidade total e parâmetros ruminais com bubalinos alimentados com dietas à base feno de <i>Cynodon ssp</i> e adição de produto à base de própolis.....	23
Resumo .....	23
Abstract .....	24
Introdução .....	25
Material e Métodos .....	26
Resultados e Discussão .....	33
Conclusões .....	45
Literatura Citada .....	46



## LISTA DE TABELAS

CAPITULO II		Página
Tabela 1.	Composição Bromatológica e percentual dos alimentos e dieta experimental.....	27
Tabela 2.	Consumo de matéria seca e dos nutrientes nas dietas.....	34
Tabela 3.	Coefficiente de digestibilidade aparente e nutrientes digestíveis totais (NDT) nas dietas.....	36
Tabela 4.	Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal e produção de ácidos graxos voláteis nas dietas.....	39
Tabela 5.	Dinâmica ruminal da fase líquida e sólida nas diferentes dietas.....	42
Tabela 6.	Síntese de proteína microbiana e eficiência de síntese microbiana (g PBmic/100 g de NDT) nas diferentes dietas.....	44

## LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II		Página
Figura 1.	pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) mg/100 mL do líquido ruminal em função do tempo após a alimentação nas diferentes dietas.....	38
Figura 2.	Concentração de ácido graxo volátil valérico em $\mu$ M/mL do líquido ruminal nas diferentes dietas.....	41

## CAPITULO I REVISÃO DE LITERATURA

### 1) Introdução

Os ruminantes são animais que possuem características singulares quando são retratados na obtenção de nutrientes através da dieta ingerida. Durante sua evolução, desenvolveram características anatômicas e simbióticas que permitiram a utilização de carboidratos estruturais como fonte de energia e compostos nitrogenados não protéicos como fonte de proteína. Essas características podem ser atribuídas ao desenvolvimento do processo fermentativo pré-gástrico (Furlan et al. , 2006)

O rúmen é habitado por bactérias, protozoários e fungos, havendo uma verdadeira simbiose entre os ruminantes e os microrganismos. A manutenção dessa simbiose se deve a algumas características ruminais que são mantidas pelo animal hospedeiro, tais como, suprimento de alimento mastigado ou ruminado, a remoção dos produtos da fermentação, adição de tamponantes e nutrientes via salivar, manutenção de pH e temperatura (Acuri et al., 2006). Em contrapartida os microrganismos fermentam os alimentos ingeridos formando metabólitos, tais como ácidos graxos voláteis (AGV) e amônia, os quais serão utilizados pelos animais. Os microrganismos utilizam também parte da amônia produzida, aminoácidos (AA), ATP e esqueletos carbônicos dos AGV, para a multiplicação da massa microbiana, ressaltando-se que o suprimento de proteína utilizado pelo animal advém dessa massa microbiana (Van Soest, 1994; Hobson, 1997). Porém, outros produtos como metano e CO<sub>2</sub> são formados, representando perdas energéticas do alimento para o meio ambiente, além da poluição causada pelas suas emissões.

Com o intuito de diminuir a emissão desses gases, metano e CO<sub>2</sub>, trabalhos de pesquisa estão sendo desenvolvidos objetivando a diminuição das perdas energéticas. Nesse contexto, a descoberta de compostos que controlam o metabolismo aumentando a

eficiência de utilização de alimentos e proporcionando uma maior produção animal, deu origem a uma classe de substâncias denominadas de aditivos alimentares que em termos simplificados, objetivam: (1) melhorar os processos benéficos, (2) minimizar, eliminar ou alterar os processos ineficientes, (3) minimizar, eliminar ou alterar os processos prejudiciais ao animal hospedeiro. Exemplos de processos cuja maximização seria válida em todas as circunstâncias são: a estabilização do ambiente ruminal, a degradação da fibra, a fermentação do lactato, a formação de ácido propiônico e a conversão de compostos nitrogenados não protéicos em proteína microbiana, enquanto os processos que deveriam ser minimizados incluem a produção de metano, degradação da proteína e absorção de amônia (Nagaraja et al., 1997; Nicodemo, 2001).

Existem alguns produtos que possuem as características de um aditivo, mostrando-se eficientes na manipulação da fermentação ruminal, por exemplo, os ionóforos (monensina, lasalocida e salinomocina) que, provavelmente, são os aditivos mais pesquisados em dietas para ruminantes. Porém em 1999, baseando-se no “Princípio da Precaução” a União Europeia banuiu a utilização desses promotores de crescimentos (Ipharraguerre, 2003), mas a proibição do uso de ionóforos como aditivos alimentares (monensina sódica e lasalocida) somente ocorreu em 2006. Este princípio é uma prerrogativa para as autoridades da UE, mesmo na ausência de dados científicos conclusivos, adotarem uma “postura preventiva” em relação a uma determinada questão. Outros países, no entanto, adotam o “Princípio da prova”, baseando-se em evidências científicas para uma tomada de decisão, como o caso dos Estados Unidos e Brasil.

Neste cenário, alguns pesquisadores estão voltando seus esforços com o intuito de encontrar um aditivo que seja considerado “natural”, substituindo assim os ionóforos e amenizando as perdas energéticas e produtivas.

Alguns produtos têm mostrado características que permitem serem utilizados como aditivo entre eles a própolis, material resinoso produzido pelas abelhas. Pesquisas com este produto mostraram que alguma característica biológica o caracteriza como substância ionófora (Mirzoeva et al., 1997). Porém há alguns questionamentos quanto à padronização do produto, em razão da obtenção da matéria-prima e a extração dos princípios ativos. Diante do fato, focou-se em pesquisas para aquisição de técnicas que padronizassem o produto e que esclarecesse melhor as propriedades biológicas, para assim obter um produto com melhor qualidade e garantia.

## 2) Própolis e suas características biológicas

A própolis é uma complexa mistura de substâncias formada por exsudatos coletados das diferentes partes da planta pelas abelhas, substâncias secretadas pelo metabolismo das abelhas e matérias que são introduzidas durante o processo de elaboração da própolis (Marcucci, 1995). Após a coleta do material resinoso, as abelhas adicionam secreções salivares e enzimas, especialmente a enzima 13-glicosidase presente na saliva da abelha, ocorrendo assim uma hidrolização dos flavonoides heterosídeos, presentes no material resinoso, tornando-os agliconas livres, as quais potencializam a atividade biológica do produto (Pereira, et al. 2002; Park et al., 1997). Esta mistura é constituída por 50% de resina contendo vitaminas, sais minerais, compostos fenólicos como flavonóides, ácidos graxos, alcoóis aromáticos e ésteres, 30% de ceras, 5% de pólen, 10% de óleos essenciais e aromáticos e 5% de outras substâncias desconhecidas (Burdock, 1998); Variações da composição podem ocorrer dependendo da época de florada e plantas visitadas pelas abelhas (Park et al., 2002), período de coleta da resina (Dos Santos et al., 1999), além da variabilidade genética das abelhas rainhas (Koo e Park et al., 1997). As abelhas utilizam a própolis para proteger sua colméia contra insetos e microrganismos, reparar frestas, na assepsia dos locais de postura da abelha rainha e mumificação de invasores (Marcucci, 1996).

Estudos verificaram algumas características biológicas da própolis, tais como ação antimicrobiana (Park et al., 1998; Buriol, 2009), antifúngica (Hegazi, 2000; Longhini, 2007), anti-inflamatória (Park et al., 1998; Sosa, 1997) e antioxidante (Park et al., 1998), cicatrizante e anestésica (Bankova 1989; Ghisalberti, 1979) e anticâncer (Buriol, 2009). Observa-se que essas propriedades são decorrentes do sinergismo que ocorre entre os diferentes compostos da própolis. Ressalta-se que a avaliação individual, após isolamento de qualquer um destes compostos, quanto a estas propriedades mencionadas, não são observados os efeitos citados (Marcucci, 1996).

A atividade antimicrobiana tem sido uma das propriedades mais pesquisadas, existindo dois prováveis mecanismos que são descritos, o primeiro através da inibição da RNA-polimerase bacteriana (Uzel et. al, 2005; Takaisi-Kikuni e Schilcher, 1994), atribuídas principalmente à flavonona pinocembrina, ao flavonol galagina e ao éster feniletílico do ácido caféico; e o segundo através da ação na membrana da parede celular dos microrganismo alterando o influxo de íons causando danos funcionais e estruturais,

sendo este efeito atribuído aos flavonoides, o ácido caféico, ácido benzóico, ácido cinâmico (Scazzacchio et al., 2005; Mirzoeva et al., 1997).

Pesquisas realizadas com o objetivo de avaliar a ação antimicrobiana da própolis em diferentes cepas de bactérias evidenciaram uma maior atividade nas bactérias Gram-positivas do que nas Gram-negativas (Vargas et al., 2004; Dos Santos, 2003). Essa característica ainda não está bem definida, contudo Vargas et al. (2004), propõem que esta propriedade está relacionada à composição química da parede celular destas bactérias, justificando que as Gram-negativas possuem uma parede celular mais complexa, o lipopolissacarídeo, constituinte dessa parede, que determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microrganismos. Além disso, esse grupo possui um teor lipídico maior comparado ao das Gram-positivas. Tais características podem estar envolvidas com a maior resistência ao extrato testado. Prado et al. (2010a), em estudos “in vitro” para avaliar cepas bacterianas tolerantes a produtos à base de própolis em diferentes concentrações e técnicas de extrações obtiveram maior seleção das bactérias Gram-positivas (80,9%) em relação às Gram-negativas (19,1%). Deve-se considerar que algumas bactérias são anaeróbicas existindo algumas dificuldades quanto ao procedimento de fixação das mesmas na lâmina, por apresentarem alta sensibilidade ao oxigênio atmosférico e se romperem durante esse processo, havendo a possibilidade da proporção entre Gram-positivas e Gram-negativas ser influenciada (Johnson *et al.*, 1995). Além disso, determinadas bactérias por serem Gram-variáveis adaptam-se ao meio em que são cultivadas e mudam a conformação de sua membrana plasmática (Hungate, 1966; Russel, 2002).

Com os atuais estudos, já se torna evidente que há uma relação entre a atividade antibacteriana do extrato e a composição química da própolis, e que esta varia de acordo com as espécies vegetais das quais a resina foi coletada, a época, entre outros fatores. Com isso torna-se necessário a elaboração de técnicas que possam padronizar as diferentes amostras de própolis e assim assegurar os mesmos compostos ativos, independente do extrato de própolis utilizado.

### 3) Própolis na manipulação ruminal

A manipulação ruminal com o uso do extrato de própolis foi inicialmente verificada por Oliveira et al. (2004), em que avaliaram “in vitro” a fermentação da proteína de três fontes de nitrogênio com diferentes compostos antimicrobianos (monensina e própolis). Os autores constataram que a própolis reduziu a produção de

amônia, induzindo ao acúmulo de proteína solúvel no meio de incubação. O mesmo foi averiguado por Stradiotti Jr et al. (2004a), com a própolis usada “*in vitro*” sobre a atividade de desaminação de aminoácidos e sobre a fermentação ruminal em bovinos, os autores verificaram que o extrato de própolis não afetou o consumo de matéria seca, o pH ruminal, as concentrações de amônia e de proteína microbiana nem as proporções molares dos ácidos graxos voláteis (AGV), porém observaram aumento da concentração de ácidos graxos voláteis e a diminuição da atividade específica de produção de amônia. Esses resultados mostraram que a própolis afetava os microrganismos responsáveis pela atividade desaminadora da proteína. A partir dessas pesquisas houve o interesse de utilizar a própolis como manipulador ruminal.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, Oliveira et al.(2006), avaliaram o efeito da própolis e da monensina “*in vitro*” sobre a fermentação ruminal dos aminoácidos. Ao final dos ensaios, a própolis foi mais eficiente que a monensina em reduzir a produção de amônia. Visto ainda que ao retirar os dois aditivos do meio de cultura, os níveis de amônia, em relação ao controle mantiveram-se baixos para a dieta com a própolis. Com isso observou-se que a ação da própolis é diferente da monensina sobre os microrganismos ruminais, agindo como um bactericida e não como um bacteriostático.

A própolis apresentou-se eficiente em inibir, “*in vitro*”, a produção de gases oriundo da fermentação (Stradiotti Jr et al., 2004b). Houve redução na produção final total de gases para os carboidratos fibrosos, sendo superior a monensina para a diluição de 66,7%. Esta constatação pode ser atribuída à ação da própolis sobre bactérias produtoras de formato e H<sub>2</sub> e a inibição de bactérias fermentadoras de celulose e produtoras de acetato. Houve um aumento da taxa de digestão específica para carboidratos fibrosos e não-fibrosos. Segundo Schofield et al (1994) a taxa de digestão específica (taxa de produção de gás) se correlaciona de forma direta e positiva com a taxa de crescimento microbiano, pode-se inferir que a própolis estimulou o crescimento microbiano.

Em alguns trabalhos não foi verificado o efeito da própolis sobre a nutrição de ruminantes.

Lana et al.(2005) avaliaram os efeitos da adição de óleo de soja (4% na MS) e/ou de extrato etanólico de própolis (30% p/v de própolis em álcool 70%) ministrando-se 10 mL por dia sobre o consumo, a digestibilidade de nutrientes, a produção e composição do leite e alguns parâmetros de fermentação ruminal de cabras leiteiras e constaram que

o óleo de soja mostrou-se mais efetivo em alterar as variáveis analisadas que o extrato etanólico de própolis.

Lana et al (2007) tentando buscar possíveis aditivos naturais para a nutrição de ruminantes, avaliaram o consumo de MS e de nutrientes e alguns parâmetros da fermentação ruminal utilizando extrato etanólico de própolis (50% p/v de própolis moída em solução alcoólica a 70% em água) em níveis crescentes (0; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0 e 12,0 mL/animal/dia) ou a própolis bruta moída (0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 6,0 g/animal/dia) e óleo de soja (0; 1,5; 3,0; 4,5; 6,0; e 7,5% da MS) na alimentação de cabras leiteiras. Os autores observaram que não houve efeito de nenhuma das dietas nos parâmetros estudados.

Com o objetivo de padronizar o extrato de própolis fornecido aos animais (concentração de própolis, teor alcoólico e dose) e também visando facilitar a administração da própolis nas rações, tem-se buscado desenvolver um produto à base de própolis denominado LLOS\*(PI 0605768-3), que consiste de um núcleo de extrato seco de própolis (em pó) o qual pode ser adicionado na porção concentrada da ração e fornecido aos animais, facilitando o manejo no campo e a conservação.

Para se obter um produto padronizado com as dosagens conhecidas de extrato de própolis, é realizado um controle de qualidade nas amostras de própolis secos com auxílio de técnicas cromatográficas, quantificando os flavonoides totais, o que contribui para a padronização do produto (Prado, 2005).

Prado et al. (2006) testaram “*in vitro*” diferentes produtos de própolis LLOS secos em três teores alcoólicos (1, 2 e 3) e quatro concentrações de própolis (LLOSA, LLOSB, LLOSC e LLOSD), monensina sódica e testemunha (sem aditivos) em dietas com relação volumoso:concentrado 50:50%. Neste ensaio, os autores observaram maior valor de digestibilidade para a dieta com adição do LLOSC1(57,4%) e os menores valores para a dieta com monensina (54,0%) seguido da dieta sem aditivo (53,0%). Pontara *et al.* (2006) testaram “*in vitro*” os mesmos produtos em dietas exclusivamente de feno de Tifton e observaram que os maiores valores de digestibilidade “*in vitro*” da MS para a adição de LLOSB3 (49,1%), LLOSC1 (45,6%) e menor valor para dietas sem aditivo e adição de monensina (39,3%).

Em ensaio de desempenho com bezerras lactentes utilizando LLOSA2, LLOSC1 e o ionóforo lasalocida, Pontara et al. (2007) observaram que não houve efeito da substituição da lasalocida pelos produtos à base de própolis sobre desempenho,



conversão alimentar e digestibilidade das rações, indicando que os produtos à base própolis podem substituir o uso do ionóforo lasalocida em bezerras lactantes.

Prado et al. (2010b) realizaram ensaios “*in vivo*” com bovinos utilizando dietas com 72,5% de volumoso (silagem de milho e feno de Tifton) e 27,5% de concentrado. Os autores observaram efeito negativo dos produtos LLOS sobre a digestibilidade total da MS e nutrientes quando comparado a testemunha e a monensina sódica. Porém Prado et al. (2010c) avaliaram os mesmos parâmetros nutricionais com os mesmos produtos em bubalinos utilizando dietas com 80% de volumoso (silagem de milho e feno de Tifton) e 20% de concentrado, e constataram que o aditivo LLOSC1 (0,018 mg/g de flavonoides totais em crisina) propiciou maiores coeficientes de digestibilidade total da matéria seca (62,8%), da matéria orgânica (63,6%), da fibra em detergente neutro (58,6%) e da fibra em detergente ácido (38,4%).

Ensaio com animais em confinamentos foram realizados utilizando o produto à base própolis (LLOS). Zawadzki et al. (2008), utilizaram o LLOSC1++ (0,054 mg/g de flavonoides totais em crisina) e a monensina em bovinos não castrados da raça Nelore com dietas 50:50 volumoso:concentrado e verificaram que o uso da própolis melhorou a conversão alimentar em 20,14% e 20,5% quando comparado a dieta controle e a monensina, respectivamente. Observaram também melhores valores de peso final, peso de carcaça quente e ganho de peso 19% superior, com o uso do produto LLOSC1++. Aguiar et al (2008) utilizando o produto LLOS em duas dosagens LLOSC1 (0,018 mg/g de flavonoides totais em crisina) e LLOSC1+ (0,036 mg/g de flavonoides totais em crisina), sobre o desempenho em bovinos mestiços não castrados, não encontraram diferenças entre as dietas, porém percebeu-se uma tendência de efeito a favor do LLOSC1+, o que mostra que a liberação das substâncias ativas da própolis pode ser influenciada pela extração alcoólica e sua concentração e, assim, atuar de maneira distinta na fermentação ruminal e, conseqüentemente, no desempenho animal.

Os resultados obtidos com a utilização da própolis na nutrição de ruminantes demonstram seu grande potencial para ser utilizada como um aditivo natural. Porém verifica-se que produtos à base de própolis causam efeitos diferentes, variando com os compostos que possuem e com as dosagens e diluições alcoólicas utilizadas. Assim podem causar efeitos positivos e negativos na manipulação ruminal, havendo necessidade de se ajustar melhor qual a dosagem ideal para cada tipo de dieta e espécie animal, a fim de obter efeito positivo na fermentação ruminal e no desempenho animal.

## LITERATURA CITADA

- ACURI, B. P.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. C. **Microbiologia Ruminar**. In: Telma Teresinha Berchelli; Alexandre Vaz Pires; Simone Gisele de Oliveira. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2006, v. 1, p. 1-21.
- AGUIAR, S. C. DE ; ZEOULA, L. M.; DO PRADO, I. N.; et al. Desempenho de bovinos em confinamento alimentados com rações 50:50% volumoso:concentrado com adição de produtos à base de própolis (LLOS). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45. Lavras, MG, 2008. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2008a]. (CD ROM).
- BANKOVA, V.; POPOV, S.; MAREKOV, N.L. Isopentenyl cinnamates from popular buds and propolis. **Phytochemistry**, v.28, p.871-873, 1989.
- BURDOCK G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food Chemical Toxicologic**. n.36: 347-363, 1998.
- BURIOL, L; FINGER, D; SCHMIDT, E.M.; et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis. **Química Nova**, v. 32, n. 2, 296-302, 2009.
- DOS SANTOS, C.R.; ARAÚJO, G.L.; CARVALHO, E.S.; et al. Controle de qualidade físicoquímico e biológico de tinturas de própolis. **Revista da Universidade de Franca**, edição especial, ano 7, n. 7, p. 35-36, 1999.
- DOS SANTOS, C.R.; ARCENIO, F., CARVALHO, E.S.; et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl., p. 71-74, 2003.
- FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e Fisiologia do Trato Gastrointestinal. In: Telma Teresinha Berchelli; Alexandre Vaz Pires; Simone Gisele de Oliveira. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2006, v. 1, p. 1-21.
- GHISALBERTI, E.L. Própolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.
- HEGAZI, A.G. Propolis: an overview. In: CONGRESO INTERNACIONAL DE PROPÓLEOS, 2000, Buenos Aires, Argentina. **Anais...** : 2000, p. 35- 53.
- HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. ed. 2, p.523 – 632, 1997.
- HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. ed. Academic Press, New York, p.533, 1966.
- IPHARRAGUERRE, I.R.; CLARK, J.H. Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.106, p.39-57, 2003.
- JOHNSON K.A.; JOHNSON, D.E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, v.75, p.2483-2492, 1995.

- KOO, M.H.; PARK, Y.K. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.61, p.367-369, 1997.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; QUEIROZ, A. C. et al. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.650-658, 2005.
- LANA, R. P.; CAMARDELLI, M. M. L.; RODRIGUES, M. T. et al. Óleo 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.
- MARCUCCI M. C.; Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v. 19, p. 529-536, 1996.
- MARCUCCI, M. C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v. 26, p. 83-99, 1995.
- MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- NAGAJARA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. Manipulation of ruminal fermentation In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (eds). **The Rumen Microbial Ecosystem**. Blackie Academic e Professional. London, p.523-632, 1997.
- NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 54 p. (Documentos / Embrapa Gado de Corte, 106).
- OLIVEIRA, J. S.; LANA, R. P.; BORGES, A.C. et al. Efeito da monensina e extrato de própolis sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.504-510, 2004.
- OLIVEIRA, S. J.; QUEIROZ, S. A.; LANA, P. R. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p. 275-281, 2006.
- PARK, Y. K.; KOO, M. H.; IKEGAKI, M. et al. Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 40, p. 97-106, 1997.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; SCAMPARINE, A.R.P.; et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**. v.2, p.997-1003, 2002.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A.S.; et al. Estudo da preparação dos extratos própolis e suas aplicações. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.18, p.313-318, 1998.
- PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, n.2, p.321-326, 2002.

- PONTARA, L. P. M.; ZEOULA, L. M.; PRADO, O. P. P. et al. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca de rações com 100% de volumoso e adição de produtos LLOS à base de própolis ou ionóforo. In: 43ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43. João Pessoa, PB, 2006. **Anais...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2006]. (CD ROM).
- PONTARA, P. P. M.; CASIMIRO, T. R.; ZEOULA, L. M. et al. Utilização do produto LLOS à base de própolis no desempenho de bezerras lactentes. In: 44ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44. Jaboticabal, SP, 2007. **Anais...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2007]. (CD ROM).
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. et al. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca de rações com 50% de volumoso e 50% de concentrado e adição de produtos LLOS à base de própolis ou ionóforo. In: 43ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43. João Pessoa, PB, 2006. **Anais...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2006]. (CD ROM).
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; PONTARA, L. P. M. et al. Isolation and expeditious morphology, biochemical and kinetic characterisation of propolis-tolerant ruminal bacteria. **Brazilian Journal of Animal Science**. 2010a.; ISSN/ISBN: 15163598
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; PONTARA, L. P. M.; et al. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dieta à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2010b. ; ISSN/ISBN: 15163598.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; PONTARA, L. P. M.; et al. 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**, 2010c. ; ISSN/ISBN: 15163598
- RUSSELL, J.B. **Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition**. Ithaca, New York, p. 119, 2002.
- SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F.D.; ALESSANDRINI, D. et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v.161, n.4, p.327-333, 2005.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.
- SOSA, S. et al. Preliminary investigation on the anti-inflammatory and anti-microbial activities of propolis. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v.7, n.4, p.168-171, 1997.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086-1092, 2004a.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de

produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1093-1099, 2004b.

TAKAISI-KIKUNI, N.B. and SCHILCHER, H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a dened propolis provenance. **Planta Medica**. v.60, p.222-227, 1994.

UZEL, A.; SORKUN, K; ÖNÇAG, Ö.; et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. **Microbiological Research** 160: 189-195. 2005.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, p. 476, 1994.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

ZAWADZKI, F., PRADO, I.N., MARQUES, J.A. et al. Própolis (LLOS) em substituição da monensina sódica no desempenho de tourinhos Nelore terminados em confinamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 45. Lavras, MG, 2008. **Anais...** Lavras: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2008]. (CD ROM).

## OBJETIVOS GERAIS

Objetivou-se com este trabalho avaliar os produtos à base de própolis (LLOS), em três concentrações de própolis (LLOSC1, LLOSC1+ e LLOSB3+) adicionados a dieta com 70% de forragem (feno de Cynodon) fornecidas a bubalinos, sobre as seguintes variáveis:

- 1- Digestibilidade total da matéria seca e dos componentes nutritivos das rações;
- 2- pH ruminal, produção de ácidos graxos voláteis, nitrogênio amoniacal, taxa de diluição, cinética de sólidos no trato gastrointestinal, volume ruminal e eficiência de síntese microbiana.

## CAPÍTULO II

### **Digestibilidade total e parâmetros ruminais em bubalinos alimentados com dietas**

#### **à base de feno de *Cynodon ssp* e adição de produto à base de própolis**

**Resumo:** Objetivou-se avaliar o consumo, a digestibilidade total da matéria seca e dos componentes nutritivos das rações, características ruminais e eficiência de síntese microbiana em bubalinos recebendo dietas à base de forragem (70% de feno de *Cynodon ssp* e 30% de concentrado) com adição de produtos à base de própolis (LLOS) em três concentrações (LLOSC1, LLOSC1+ e LLOSB3+). Quatro búfalos mestiços (½ Murrah x ½ Jafarabadi) castrados, com  $519,0 \pm 13,0$  kg foram utilizados em quadrado latino 4x4, com quatro dietas (controle, LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+) e quatro períodos. A dieta foi formulada para conter 60% de NDT e 11% de PB. Os consumos de MS não diferiram entre as dietas experimentais. A adição de produto LLOSC1 propiciou maior ( $P < 0,05$ ) coeficiente de digestibilidade (CD) da MS (62,7% vs 67,2%), da MO, da FDN (56,6% vs 61,7%), dos CT e dos NDT (62,8% vs 66,1%) quando comparado à dieta controle. Ainda verificou-se tendência ( $P \leq 0,10$ ) para maior CD da FDA (49,6% vs 55,1%), entre o LLOSC1 e a dieta controle. Houve efeito do horário e dieta ( $P < 0,05$ ) sobre o pH ruminal, e o menor valor de pH (6,65) foi para o produto LLOSC1. Propiciou-se maior produção ( $P < 0,05$ ) de AGV totais (141,89 vs 129,15) e tendência ( $P \leq 0,10$ ) de maior produção de acetato (97,73 vs 88,21  $\mu\text{M/mL}$ ) com o uso produto LLOSC1 em relação à dieta controle. As variáveis de dinâmica ruminal e a eficiência de síntese microbiana (média de 9,85 g de PBmic/100 g de NDT) não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre as dietas. Portanto, conclui-se que o produto LLOSC1 pode ser indicado para melhorar a eficiência de dietas à base de forragem para bubalinos.

**Palavras-chave:** ácidos graxos voláteis, aditivo, eficiência microbiana, fermentação ruminal, taxa de passagem

**Total digestibility and ruminal parameters in buffaloes fed with diets based on  
*Cynodon* spp hay with addition of propolis based products**

**Abstract:** It was evaluated the feed intake, the dry matter (DM) and nutrients total digestibility, ruminal characteristics and microbial efficiency in buffaloes fed with diet based on forage (70% of *Cynodon* spp hay and 30% of concentrate) with the addition of propolis based products (LLOS) in three concentrations (LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+). Four crossbred buffaloes (Murrah ½ x ½ Jafarabadi), castrated, with 519.0 ± 13.0 kg were used in a 4x4 latin square with four treatments (Control, LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+) and four periods. The diet was formulated to contain 60% of TDN and 11% of CP. The DM intake did not differ between the experimental diets. The addition of the LLOSC1 product increased (P <0.05) the coefficient of digestibility (CD) of DM (62,7% vs 67,2%), OM, NDF (56,6% vs 61,7%), CHT and TDN (62,8% vs 66,1%) . There was a tendency (P ≤ 0,10) for a higher CD of ADF (49,6% vs 56,5%), between the LLOSB3+ and the control diet. It was observed a significant effect of time and treatments (P <0.05) on ruminal pH, and the lowest pH (6.65) was obtained for LLOSC1 treatment. The LLOSC1 product provided higher production (P <0.05) of total VFA (141.89 vs 129.15) and trended (P ≤ 0.10) to a higher production of acetate (97.73 vs. 88.21 mM / mL) compared to the control. The ruminal dynamic variables and the efficiency of microbial synthesis (average of 9.85 g CPmic/100 g TDN) did not differ (P> 0.05) between treatments. Therefore, it is concluded that the product LLOSC1 may be indicated to improve the efficiency of diets based on forage for buffaloes.

**Keywords:** additive, microbial efficiency, passage rate, rumen fermentation, volatile fatty acids.



## Introdução

Os sistemas semiextensivos e extensivos são os mais utilizados na criação de bubalinos, que se caracterizam pelo fornecimento quase que exclusivo de forragens. Dietas forrageiras apresentam um padrão de fermentação ruminal que resulta em produção de  $H_2$  e formato, estes produtos precursores do metano (Valadares e Pina, 2006). Segundo Lana et al. (1998), a produção de metano pode corresponder a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido.

O uso de ionóforo tem sido reconhecido como promovedor da melhor eficiência alimentar em ruminantes por provocar alterações nos padrões de fermentação ruminal, porém, recentemente a própolis também tem-se mostrado um interessante aditivo na nutrição animal, além de ser um produto natural, atendendo as exigências de alguns mercados consumidores de carne e leite. Os experimentos até agora publicados no Brasil com ruminantes, apesar de testarem a própolis não apresentam uma padronização quanto à concentração de própolis, ao teor alcoólico de extração e nem as dosagens dos extratos de própolis. Assim, esses parâmetros variam de experimento para experimento produzindo resultados diferentes.

Com o intuito de eliminar aquelas variáveis foi produzido um produto à base de própolis denominado LLOS\*(PI 0605768-3), que consiste de um núcleo com extrato seco de própolis (em pó), o qual pode ser adicionado à ração e fornecido aos animais. O controle de qualidade é obtido com auxílio de técnicas cromatográficas de alta eficiência (HPLC), para quantificar os flavonoides presentes (Prado, 2005).

Dentre os produtos testados em bubalinos quando alimentados com dietas à base de forragem, foram registrados como os mais promissores, o produto LLOSC1 (concentração de própolis C e teor alcoólico 1) seguido pelo LLOSB3 (concentração de própolis B e teor alcoólico 3) que continham, respectivamente, 0,018 mg/g e 0,011mg/g

de flavonoides totais em crisina (Prado et al., 2010c). Assim objetivou-se confirmar as ações de diferentes produtos à base de própolis (LLOS) e avaliar três concentrações dos produtos (LLOSC1, LLOSC1+, LLOSB3+), em dieta à base de forragem (feno de *Cynodon ssp*) sobre o consumo, digestibilidade total, características ruminais, taxa de passagem e eficiência da síntese microbiana em bubalinos.

### **Materiais e Métodos**

O experimento foi conduzido, no setor de Bovinocultura de Corte da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI) e no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia pertencentes à Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Foram utilizados quatro búfalos mestiços ( $\frac{1}{2}$  Murrah x  $\frac{1}{2}$  Jafarabadi) castrados, com peso corporal inicial de  $519,0 \pm 13,0$  kg. Os animais foram fistulados no rúmen e mantidos em baias individuais cobertas, com piso de concreto, providas de comedouro e bebedouro.

Os animais foram alimentados com uma dieta à base de feno (70% de feno *Cynodon* e 30% de concentrado) e foi formulada de acordo com as recomendações propostas pelo NRC (1996), para conter 60% de NDT e 11% de proteína bruta. A composição bromatológica e percentual dos alimentos e da ração total constam na Tabela 1. As dietas experimentais diferiram somente para a inclusão ou não dos aditivos sendo denominados: controle (sem aditivo), LLOSC1, LLOSC1+, LLOSB3+.

Os produtos à base de própolis utilizados como aditivo alimentar no experimento foram preparados de acordo com a metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999) em duas extrações alcoólicas: 1 e 3 e duas concentrações de própolis: B e C (LLOSB3 e LLOSC1), os quais estão patenteados como patrimônio intelectual sob o nº PI 0605768-3.

Para a avaliação da inclusão desses produtos a dieta, foi utilizado o dobro da dose inicial de LLOSB3 (0,011 mg/g de flavonoides totais em crisina) e LLOSC1 (0,018 mg/g de flavonoides totais em crisina), estudados anteriormente pelo grupo de pesquisa de Nutrição de Ruminantes/UEM, e doravante foram denominados de LLOSB3+ e LLOSC1+. Assim os aditivos adicionados a dieta perfazendo três dietas foram: LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+, os quais apresentaram, respectivamente, as seguintes concentrações de flavonoides totais em crisina, 0,022 mg/g; 0,018 mg/g e 0,036 mg/g do produto, quantificados por Prado (2005).

Tabela 1- Composição Bromatológica e percentual dos alimentos e dieta experimental

Alimentos	Composição (% MS)								% na dieta
	MS	MO	PB	EE	FDN	FDA	CHOT	CNF	
F. de Cynodon	91,94	93,0	9,6	1,0	72,2	42,8	81,8	8,02	70,0
Farelo de soja	90,8	93,2	49,9	2,0	14,9	8,5	41,4	27,4	4,4
Milho moído	90,4	98,9	8,9	3,5	9,9	3,7	86,6	77,7	25,1
Sal Mineral	91,6	-	-	-	-	-	-	-	0,6
Dieta total (70:30) <sup>1</sup>	91,4	94,1	11,1	1,6	53,3	31,3	80,8	26,3	100,00

<sup>1</sup>Ração volumoso:concentrado

A ração completa foi fornecida duas vezes ao dia, em duas porções iguais, pela manhã (8h) e a tarde (16h). A sobra foi regulada entre 5 a 10% do consumo. Os produtos à base de própolis, LLOS, eram fornecidos diariamente, em duas doses intrarruminais, de cinco gramas, previamente pesadas e acondicionadas em papel higroscópio, imediatamente após o fornecimento das rações. Também após a alimentação e da mesma forma, cinco gramas do indicador externo (óxido crômico - Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) eram fornecidos em duas doses intrarruminais (às 8h da manhã e às 16h da tarde), durante todo o período experimental, para determinação dos fluxos diários de matéria seca fecal.

Cada período experimental (quatro períodos) teve a duração de 22 dias, sendo 14 dias para adaptação dos animais e oito dias de coletas e mais um intervalo de sete dias de descanso, sem o fornecimento de aditivos, entre cada período experimental. Os animais foram pesados no início e no final de cada período, para se calcular a quantidade de alimento a ser fornecida.

Do primeiro ao quinto dia do período de coleta, foram amostrados às 8:00 horas sobras e alimentos fornecidos e em torno de 200 g de fezes foram coletados diretamente do reto às 8:00 e às 16:00 horas e congeladas para posteriores análises de cromo, matéria seca (MS) e nutrientes.

No sexto dia de coleta, para avaliar a taxa de diluição, foi administrado no rúmen dos animais 30 g de Co-EDTA diluídos em 500 mL de água destilada antes da primeira alimentação, conforme descrito por Uden et al. (1980). O líquido ruminal (100 mL) foi coletado via cânula ruminal, nos tempos 0 (que antecede a primeira alimentação) 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 24 horas após a alimentação da manhã através de uma bomba manual adaptada para sucção em vários pontos do rúmen.

O pH ruminal foi medido imediatamente após a coleta do líquido ruminal nos tempos 0, 2, 4, 6, 8 horas. Foram separados 50 mL de líquido ruminal para análises de concentração de Cobalto, 25 mL acidificados com 0,5 mL de ácido sulfúrico 1:1 para determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e 25 mL acidificados com 6,2 mL de ácido metafosfórico (25%) para determinação de ácidos graxos voláteis (AGV). Todas as amostras foram armazenadas separadamente em embalagens plásticas específicas, etiquetadas e congeladas a -20°C para posteriores análises químicas.

Também no sexto dia de coleta, foi realizada uma coleta “spot” de urina, aproximadamente quatro horas após a alimentação, durante micção espontânea, para a determinação da produção microbiana. As amostras foram filtradas em papel filtro tipo

“café” para evitar possível contaminação. Uma alíquota de 15 mL de urina foi diluída em 135 mL de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) 0,036 N a fim de evitar destruição bacteriana dos derivados de purina (DP) e precipitação do ácido úrico. As amostras de urina foram armazenadas em geladeira (5°C) e, posteriormente, submetidas às análises.

O esvaziamento ruminal, para determinação da cinética de sólidos no trato gastrointestinal e volume ruminal foi realizado no sétimo e oitavo dia, respectivamente, 4 horas após a primeira alimentação e uma hora antes da segunda alimentação, segundo adaptação da metodologia de Huhtanen et al. (2007). A retirada de todo conteúdo ruminal era feita via fistula ruminal, manualmente; a separação da fase sólida e líquida foi realizada por prensagem manual e em seguida eram pesadas para se obter a proporção de líquido e sólido presente no conteúdo. Uma amostra proporcional de líquido e de sólido (peso/peso) foi retirada para formar uma amostra composta (2,0 kg) para se conhecer a percentagem de matéria seca (MS) no conteúdo ruminal. Após secagem em estufa á 55°C, às amostras do conteúdo ruminal dos dois dias foram misturadas para serem analisadas quanto à composição química. Os procedimentos de evacuação, prensagem e retorno da digesta ao rúmen ocorria em aproximadamente 20 minutos.

Após o período de coleta, as amostras de alimento, sobras e fezes foram secas em estufa a 55°C por 72 horas, moídas (2 mm e 1 mm) individualmente e após misturadas em quantidades iguais, com base no peso seco em estufa a 55°C, para formar amostras compostas de alimentos, sobras e fezes por animal/período/dieta.

A concentração de cromo nas fezes foi determinada por espectrometria de absorção atômica após digestão nitro-perclórica (Kimura & Miller, 1957).

A dosagem de amônia nas amostras de líquido ruminal foi obtida pela técnica de Ferner (1965), modificada por Vieira (1980).

Para determinação dos ácidos graxos voláteis (AGV) as análises foram realizadas no Departamento de Zootecnia – USP/ESALQ. As amostras foram centrifugadas a 14.000 g (4°C), durante 40 minutos, sendo analisadas de acordo com Palmquist & Conrad (1971) em cromatógrafo líquido-gasoso (Hewlett Packard 5890 Series II GC), equipado com integrador (Hewlett Packard 3396 Series II Integrator) e injetor automático (Hewlett Packard 6890 Series Injector). O padrão interno utilizado foi o ácido 2-metilbutírico sendo acrescentado, em cada tubo para leitura em cromatógrafo, 100 µL de solução padrão interno 800 µL da amostra. Uma mistura de 76 ácidos graxos voláteis com concentração conhecida foi utilizada como padrão externo para a calibração do integrador.

A taxa de diluição ruminal foi estimada pela diminuição da concentração de cobalto (Co) ruminal em função do tempo. Para a determinação da concentração de Co, as amostras de líquido de rúmen, após o descongelamento, foram centrifugadas a 3700 rpm por 30 minutos. As concentrações de cobalto nas amostras de líquido ruminal foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (Uden et al., 1980).

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

e a taxa de reciclagem (TRec) da fase líquida ruminal foi calculada conforme Maeng & Baldwin (1976):  $TRec (\text{n}^\circ \text{ de vezes/dia}) = 24 \text{ h/TeR}$ .

O volume ruminal obtido pelo esvaziamento do conteúdo ruminal foi estimado a partir do peso da água que correspondeu ao volume total do conteúdo ruminal retirado e medido diretamente em tambores coletores.

Os parâmetros de cinética de sólidos no trato gastrointestinal foram calculados segundo Robinson et al. (1987), como: taxa de ingestão [ $k_i = ((\text{ingestão do nutriente}/24)/\text{pool ruminal do nutriente}) * 100$ ]; taxa de passagem [ $k_p = ((\text{excreção fecal do nutriente}/24)/\text{pool ruminal do nutriente}) * 100$ ]; taxa de digestão [ $k_d = k_i - k_p$ ].

Para obter as concentrações dos derivados de purina, presentes na urina, foram realizadas as análises de alantoína segundo metodologia descrita por Chen & Gomes (1992) e a creatinina e ácido úrico, foram determinados em laboratório especializado, Centro de Diagnóstico Laboratorial – CEDLAB, localizado na cidade de Maringá – PR.

A partir da concentração de creatinina foi estimado o volume urinário (expresso em L), dividindo-se a excreção diária de creatinina,  $\text{mmol/kg PV}^{0,75}$ , pela concentração de creatinina ( $\text{mmol/L}$ ). Para determinação da excreção diária de creatinina ( $\text{mmol/kg PV}^{0,75}$ ), foi adotado o valor médio de  $0,44 \text{ mmol/kg PV}^{0,75}$ , obtido por Chen et al. (1996) para bubalinos. A produção de nitrogênio (N) microbiano foi calculada a partir da quantidade de purinas absorvidas (X,  $\text{mmol/dia}$ ), a qual foi estimada a partir da excreção urinária de derivados de purina (DP) (Y,  $\text{mmol/dia}$ ), através da equação descrita por Dipu et al (2006) para bubalinos:  $Y = 0,74X + (0,117 \text{ PV}^{0,75})$ ; em que o valor de 0,74 representa a recuperação de purinas absorvidas como DP na urina e o valor da constante  $0,117 \text{ mmol/kg de PV}^{0,75} / \text{dia}$  representa a contribuição endógena líquida de DP em bubalinos. A síntese de compostos nitrogenados microbianos no

rúmen (Y, gN/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), por meio da equação descrita por Chen & Gomes (1992):

$$\frac{Y = X \text{ (mmol / dia) } \times 70}{0,116 \times 0,83 \times 1000}$$

em que 70 representa o conteúdo de N nas purinas (mgN/mmol); 0,83 a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116 representa a razão N-purina:N total dos microrganismos ruminais.

A estimativa de PB microbiana (SPBmic) foi obtida ao se multiplicar a síntese de N microbiano por 6,25, enquanto a eficiência de síntese de proteína microbiana foi determinada como: EPBmic (g/100 g) = SPBmic (g)/CNDT (100 g), em que CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais.

Os coeficientes de digestibilidade totais da matéria seca (MS) e componentes nutritivos das rações foram calculados de acordo com as fórmulas descritas por Coelho da Silva & Leão (1979).

Os teores de MS, cinza, PB e EE foram determinados de acordo com a metodologia contida em Silva & Queiroz (2006) e estimou a MO. As determinações da fibra em detergente neutro (FDN), da fibra em detergente ácido (FDA), foram analisadas de acordo com Van Soest et al. (1991), e dos resíduos provenientes da FDN, o nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), foi determinado de acordo com Licitra et al. (1996). Para a quantificação dos carboidratos totais (CHOT), foi utilizada a equação:  $100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$  e os teores de carboidratos não fibrosos (CNF) foram obtidos pela diferença entre os teores de CHOT e  $FDN_{PB}$ , em que  $FDN_{PB}$  constitui a parede vegetal isenta de proteína bruta, segundo Sniffen et al. (1992).

Utilizou-se o delineamento experimental, em quadrado latino 4x4, com quatro animais, quatro períodos e quatro dietas, para comparar o consumo e os coeficientes de



digestibilidade aparente. As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas pelo programa SAS (2001) por meio de análise de variância no procedimento PROC GLM e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Tukey considerando 5% o grau de significância e até 10% de probabilidade como tendência.

Para os valores observados de pH, N-NH<sub>3</sub> e AGV no líquido ruminal, procederam-se à subdivisão das parcelas experimentais em função dos tempos de amostragem. Foi utilizada a análise de regressão para as concentrações de pH, N-NH<sub>3</sub> e AGV do líquido ruminal em função do tempo após a alimentação da manhã (0, 2, 4, 6 e 8 horas) para cada dieta.

### **Resultados e discussão**

Não houve diferença entre as dietas ( $P>0,05$ ) para o consumo de MS e componentes nutritivos para as dietas experimentais (Tabela 3), com valores médios de consumo de 1,56% de MS e 0,88% de FDN do peso corporal (PC). O consumo de matéria seca foi intermediário àqueles relatados para bubalinos de 1,4% PC (Maeda et al., 2007) e de 1,91% PC (Prado et al., 2010c) quando utilizaram silagem de milho como volumoso, independente da razão volumoso:concentrado de 77:23%, 57:43% e 37:63% ou 80:20 respectivamente. Menores valores de consumo de matéria seca (7,6 kg/dia e 1,28% PC) também foram observados em bubalinos alimentados com dietas à base de forragem (silagem de milho e palha de trigo) e razão volumoso:concentrado de 85:15 (Cutrignelli et al., 2007). A dieta utilizada no presente trabalho apresentou 55% de FDN e aliado ao baixo consumo da FDN, considera-se que este nutriente não foi a causa do baixo consumo dos animais, visto que segundo Coelho da Silva (2006) a redução na ingestão pode ocorrer em dietas com níveis acima de 60% de FDN.

Além da concentração de fibra na dieta outros dois fatores podem estar associados ao baixo consumo, como enfatizado por Coelho da Silva (2006). O primeiro é relacionado à distensão no rúmen - retículo (RR) e a limitação ocorre em razão do maior tempo de remoção da digesta do RR por digestão, absorção e passagem. O segundo é pertinente ao atributo intitulado como “sabedoria nutricional”, em que os animais aprendem a preferir um alimento ou outro, mesmo que a diferença seja o sabor ou aparência. Assim, ressalta-se que antes de iniciar o período experimental, os bubalinos alimentavam-se de pasto e silagem de milho e quando foi fornecido aos animais o feno de *Cynodon*, o período de adaptação teve que ser prolongado.

Tabela 2- Consumo de matéria seca e dos nutrientes nas dietas

		Dietas <sup>1</sup>						
		Controle	LLOSC1	LLOSC1+	LLOSB3+	P <sup>2</sup>	EP <sup>3</sup>	CV <sup>4</sup>
		Consumo						
Matéria Seca	kg/dia	8,44	8,04	8,68	8,44	0,32	0,13	5,85
	%PC	1,57	1,51	1,62	1,52	0,21	0,02	4,79
	g/PM	75,76	73,75	77,88	73,04	0,33	1,10	5,07
Matéria orgânica	kg/dia	7,95	7,56	8,16	7,69	0,31	0,12	5,80
	g/PM	71,32	68,33	73,21	68,70	0,21	0,99	4,81
Proteína Bruta	kg/dia	0,95	0,92	0,98	0,92	0,31	0,02	5,53
	g/PM	8,50	8,26	8,81	8,22	0,19	0,20	4,58
Extrato Etéreo	kg/dia	0,15	0,14	0,15	0,14	0,27	0,004	4,72
	g/PM	1,32	1,27	1,35	1,28	0,10	0,38	3,45
FDN	kg/dia	4,73	4,47	4,89	4,59	0,32	0,08	6,61
	%PC	0,88	0,87	0,91	0,85	0,48	0,02	6,02
	g/PM	42,47	40,39	43,84	40,98	0,23	0,71	5,57
FDA	kg/dia	2,52	2,38	2,62	2,45	0,27	0,05	6,71
	g/PM	22,65	21,52	23,54	21,85	0,20	0,39	5,86
Carboidratos Totais	kg/dia	6,81	6,46	6,98	6,58	0,32	0,10	5,90
	g/PM	61,11	58,43	62,66	58,82	0,21	0,88	4,91
CNF	kg/dia	2,38	2,28	2,41	2,29	0,39	0,03	5,22
	g/PM	21,34	20,64	21,66	20,44	0,29	0,28	4,52
NDT	kg/dia	4,08	4,30	4,52	4,18	0,34	0,08	7,90

g/PM	36,58	38,92	40,55	37,28	0,27	0,73	7,48
------	-------	-------	-------	-------	------	------	------

Médias na mesma linha, seguida de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% e a 10% como tendência; <sup>1</sup>LLOS: produto à base de extrato de própolis que diferem na concentração de flavonoides totais (LLOB3+, LLOSC1, LLOSC1+); <sup>2</sup>probabilidade; <sup>3</sup>Erro padrão; <sup>4</sup>Coefficiente de Variação; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; CNF: Carboidratos não fibrosos; NDT: Nutrientes digestíveis totais.

Esse processo resultou num período de aproximadamente 45 dias para estabilização do consumo e para dar início ao primeiro período de coleta.

De acordo com Zicarelli (2001), a variação na ingestão de matéria seca observada nesta espécie frequentemente está relacionada ao regime alimentar precedente, o que leva o animal modificar o consumo para alcançar a condição corporal mais condizente com estado fisiológico do momento.

Se considerar os pesos dos búfalos ao início do experimento, média de 519 kg e a idade de dois anos e meio, próximo da fase adulta, e aliado ao regime alimentar a que estavam submetidos antes do início do experimento. Provavelmente, além das condições supracitadas que refletiram no baixo consumo observado, podem ter ocorrido outras. Todavia, o consumo de PB e NDT ficaram acima das exigências de manutenção de 0,556 kg de PB/dia e 3,65 kg de NDT/dia para bubalinos com 500 kg de PC, segundo Kearl (2003). Assim, os animais que pesavam inicialmente 519 kg, não perderam peso durante todo o período experimental (112 dias), com ganho médio diário de 230 g/dia.

Houve diferenças entre as dietas ( $P < 0,05$ ) para os coeficientes de digestibilidade total (CD) da MS e dos componentes nutritivos (Tabela 3). A adição de produto à base de própolis LLOSC1 refletiu em maiores ( $P < 0,05$ ) valores que a dieta controle, para a matéria seca, a matéria orgânica, a fibra em detergente neutro, os carboidratos totais e os nutrientes digestíveis totais e tendência ( $P \leq 0,10$ ) para maior CD da fibra em detergente ácido. Para o CD da proteína bruta, do extrato etéreo e dos carboidratos não fibrosos, não houve diferença entre as dietas.

As diferenças observadas para o CD da MS estão de acordo com o observado por

Pontara et al. (2006) que obtiveram maior digestibilidade “in vitro” da matéria seca (DIVMS) para o LLOSC1 (45,6%) que a dieta controle (39,3%) com 100% de feno e por Prado et al. (2010c) que obtiveram maiores valores de CD da MS para LLOSC1 que a dieta controle (62,8% vs 59,4%) quando bubalinos foram alimentados com dieta com 80:20% de volumoso:concentrado.

Tabela 3- Coeficiente de digestibilidade aparente e nutrientes digestíveis totais (NDT) nas dietas

	Dieta <sup>1</sup>				P <sup>2</sup>	EP <sup>3</sup>	CV <sup>4</sup>
	Controle	LLOSC1	LLOSC1+	LLOSB3+			
Matéria Seca (%)	62,7b	67,2a	66,2ab	66,1ab	0,030	0,80	2,45
Matéria Orgânica (%)	63,7b	68,1a	67,1ab	66,9ab	0,033	0,80	2,39
Proteína Bruta (%)	64,2	68,1	68,8	67,1	0,253	1,50	4,49
Extrato Etéreo (%)	71,4	77,9	76,0	75,6	0,429	2,62	6,96
FDN (%)	56,6b	61,7a	60,0a	60,7a	0,051	0,61	2,05
FDA(%)	49,6b	55,1ab	52,8ab	56,5a	0,099	1,66	6,21
CT (%)	63,2b	67,7a	66,4ab	66,5ab	0,027	0,77	2,33
CNF (%)	76,5	76,3	78,2	77,4	0,941	2,50	6,51
NDT	62,8b	66,1a	65,6ab	65,5ab	0,038	0,63	1,95

Médias na mesma linha, seguida de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% e a 10% como tendência; <sup>1</sup>LLOS: produto à base de extrato de própolis que diferem na concentração de flavonoides totais (LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+); <sup>2</sup>Probabilidade; <sup>3</sup>Erro padrão; <sup>4</sup>Coeficiente de Variação; FDN: Fibra em detergente neutro; FDA: Fibra em detergente ácido; CT: Carboidratos totais; CNF: Carboidratos não fibrosos; NDT: Nutrientes digestíveis totais.

O produto aumentou o CD da FDN quando comparado ao controle, isto confirma aquele observado por Prado et al. (2010c), no qual o CD da FDN aumentou com o produto LLOSC1 fornecidos a bubalinos em relação à dieta com monensina e o controle, porém não há diferença no CD entre os produtos LLOS, mostrando que as diferentes dosagens e/ou concentrações utilizadas não causaram efeito nos microorganismos que digerem a fibra.

Constatou-se maior ( $P < 0,05$ ) CD da FDA com o LLOSB3+ em relação à dieta controle, porém não diferiu dos demais produtos LLOS. Também não ocorreram diferenças entre os produtos LLOSC1 e LLOSC1+ e o controle.

O aumento do CD da FDN e dos CT podem ser decorrente da ação do produto LLOSC1 em selecionar bactérias que degradam celulose e celobiose, como constatado em estudos “*in vitro*” por Prado et al. (2010a) que indicaram que o produto à base de própolis LLOSC1 selecionou bactérias ruminais capazes de degradar todos os carboidratos testados, como celulose, celobiose, arabinose, xilose, frutose, lactose e glicose.

Os nutrientes digestíveis totais foram maiores ( $P < 0,05$ ) quando da adição de LLOSC1 e corrobora com os valores de NDT registrados por Prado et al. (2010c) para dietas à base de forragem com adição de LLOSC1 que a dieta controle, fornecidas a bubalinos (65,8 vs 62,3). Os valores de NDT observado ficaram acima daqueles estimados inicialmente, sendo suficiente para manter os animais e possibilitar ganhos de peso em torno de 230 g/dia.

Para a variável pH ruminal houve efeito ( $P < 0,05$ ) da dieta e do horário, não havendo efeito de interação entre eles. Em média o valor de pH foi de 6,71, considerado ótimo para o desenvolvimento das bactérias celulolíticas. O menor ( $P < 0,05$ ) valor de pH de 6,44 às 8 horas, observado nos animais que receberam o aditivo LLOSC1, acima de 6,2 considerado crítico para o desenvolvimento das bactérias celulolíticas (Van Soest, 1994). As dietas controle, LLOSC1+ e LLOSB3+ não diferiram entre si, apresentando valores médios de pH de 6,73. Valor mais elevado que o observado com a adição de LLOSC1 (Figura 1). Os altos valores de pH obtidos provêm da dieta à base de forragem que propicia maior tempo de ruminação e portanto, melhor tamponamento do conteúdo ruminal (Sivkova et al., 1997).

Observou-se queda linear do pH em função do tempo. A variação do pH é dependente do tipo de dieta consumida, dietas à base de forragem possuem uma taxa de fermentação ruminal lenta, com uma acidificação do rúmen mais delongada (Nussio et al., 2006).

Observou-se para a concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) efeito do tempo de coleta com comportamento cúbico (P<0,05), porém não houve efeito (P>0,05) da dieta, como também interação de tempo e a dieta. O valor máximo da produção de N-NH<sub>3</sub> foi de 21,10 mg/100 mL às 1h82 e a produção mínima de 10,07 mg/100 mL às 6h37 após a alimentação da manhã, independente das dietas experimentais (Figura 1).

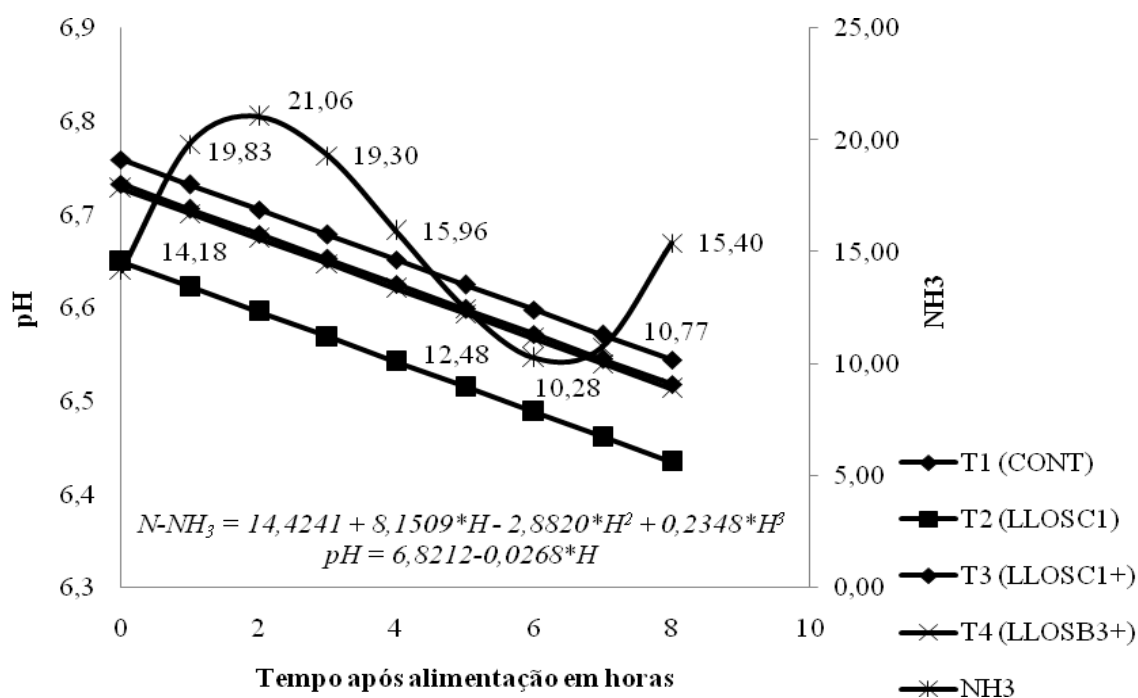


Figura 1 – pH e concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) mg/100 mL do líquido ruminal em função do tempo após a alimentação nas diferentes dietas.

O valor mínimo de produção de N-NH<sub>3</sub> encontra-se acima do intervalo proposto por Hoover (1986) de 3,3 a 8,0 mg/100 mL para que ocorra a fermentação ruminal e o valor máximo está dentro do intervalo proposto por Mehrez et al. (1977) de 19 a 23 mg/100 mL para a máxima atividade fermentativa no rúmen.

Os bubalinos apresentam melhor atividade da reciclagem salivar da uréia e balanço positivo do nitrogênio (Tewatia & Bhatia, 1998; Trufchev et al., 1997).

Houve diferença entre as dietas para a ( $P < 0,05$ ) a concentração dos AGV totais, ácido propiônico, ácido butírico, ácido isobutírico, ácido isovalérico e a razão acetato:propionato (Tabela 4). Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre as dietas para o ácido valérico, porém houve efeito de horário com comportamento cúbico ( $P < 0,05$ ).

Tabela 4- Valores médios de pH ruminal, nitrogênio amoniacal e produção de ácidos graxos voláteis nas dietas

	Dietas <sup>1</sup>				P <sup>2</sup>	EP <sup>3</sup>	CV <sup>4</sup>
	Controle	LLOSC1	LLOSC1+	LLOSB3+			
pH	6,76a	6,65b	6,73a	6,73a	0,004	0,02	2,23
N-NH <sub>3</sub> (mg/100mL)	16,29	14,94	15,25	15,12	0,788	0,65	37,49
AGV total (μM/mL)	129,15b	141,89a	130,07ab	133,49ab	0,038	2,21	14,57
Acetato (μM/mL)	88,21b	97,73a	91,30ab	92,39ab	0,084	1,68	6,03
Propiônico (μM/mL)	21,13ab	22,07a	20,10b	21,06ab	0,059	0,35	14,50
Butírico (μM/mL)	14,05b	16,15a	13,60b	14,57b	0,001	0,32	19,44
Isobutírico (μM/mL)	1,50a	1,60a	1,33b	1,51a	0,001	0,02	6,50
Valérico (μM/mL)	1,77	1,81	1,64	1,77	0,346	0,04	1,55
Isovalérico (μM/mL)	2,34ab	2,51a	2,12b	2,18b	0,001	0,05	7,89
Acetato:Propionato	4,18b	4,44ab	4,54a	4,43ab	0,051	0,06	11,34

Médias na mesma linha, seguida de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% e a 10% como tendência; <sup>1</sup>LLOS: produto à base de extrato de própolis que diferiram na concentração de flavonoides totais (LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+); <sup>2</sup>Probabilidade; <sup>3</sup>Erro padrão; <sup>4</sup>Coefficiente de Variação;

Os valores obtidos com as diferentes dietas encontram-se bem acima dos observados na literatura em bubalinos. Prado et al. (2010c) observaram valores de 73,51 μM/mL, 52,58 μM/mL, 12,98 μM/mL e 7,94 μM/mL para AGV total, acetato, propionato e butirato, respectivamente. Avaliando níveis de FDN na dieta em bubalinos, Souza (2000) obteve valores de 75,01 μM/mL, 55,05 μM/mL, 13,26 μM/mL e 6,27 μM/mL para AGV total, acetato, propionato e butirato, respectivamente, com 54% de FDN na dieta.

O produto à base de própolis LLOSC1 apresentou tendência ( $P \leq 0,10$ ) de maior produção de ácido acético, estando coerente com os maiores valores de CD da FDN observados com o produto LLOSC1, isto mostra que há uma mudança no padrão de

fermentação ruminal, com a seleção de microrganismos fibrolíticos. O ácido acético é um precursor da gordura do leite (Valadares e Pina, 2006), e é sabido que a espécie bubalina apresenta uma maior percentagem de gordura no leite (Amaral et al., 2005). Este resultado poderia incrementar, ainda mais, os teores de gordura no leite de búfalas.

A concentração de propionato se apresentou mais elevada com o aditivo LLOSC1 e mais baixa com o aditivo LLOSC1+. O aditivo LLOSC1+ foi usado em quantidade 100% maior que o aditivo LLOSC1, o que pode ter acarretado em maior eliminação das bactérias produtoras de propionato, pelo aditivo LLOSC1+.

O aditivo LLOSC1 aumentou a concentração de butirato ( $P < 0,05$ ) em relação aos demais aditivos e ao controle. Entretanto Prado et al. (2010c) constatou maior produção de butirato com o uso do aditivo LLOSB3, quando comparado com o LLOSC1, em bubalinos. Segundo Van Nevel & Demeyer (1988), maiores concentrações de propionato acarretam em menor concentração de butirato. Essa observação não pode ser constatada no presente trabalho em consequência do aumento concomitante para o propionato e butirato.

Observou-se produção máxima de  $1,92 \mu\text{M/mL}$  às 2h48 e a produção mínima de  $1,63 \mu\text{M/mL}$  às 6h44, para o ácido valérico, independente das dietas (Figura 2).

Houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre as dietas para a produção de AGV de cadeia ramificada. A menor proporção de isobutirato foi para a adição dos produtos à base de própolis LLOSC1+ e as demais dietas não diferiram entre si. Entre os produtos LLOS, a maior produção de isovalerato foi para o LLOSC1 que não diferiu da dieta controle, sendo este ácido graxo formado a partir da desaminação oxidativa da leucina no rúmen. Os ácidos de cadeia ramificada resultantes da deaminação dos aminoácidos são importantes no fornecimento de esqueleto de carbono principalmente para o crescimento de bactérias celulolíticas (Val Neto, 2009).



A razão acetato:propionato foi maior para o aditivo LLOSC1+, sobressaindo a dieta controle. Em dietas com um maior teor de fibra, observa-se um aumento na razão acetato:propionato, pelo aumento da produção de acetato. Como as dietas se diferenciavam apenas pela presença do aditivo, pode-se considerar que o aditivo LLOSC1+ causou uma pressão de seleção aumentando as bactérias celulolíticas e diminuindo as bactérias formadoras de propionato.

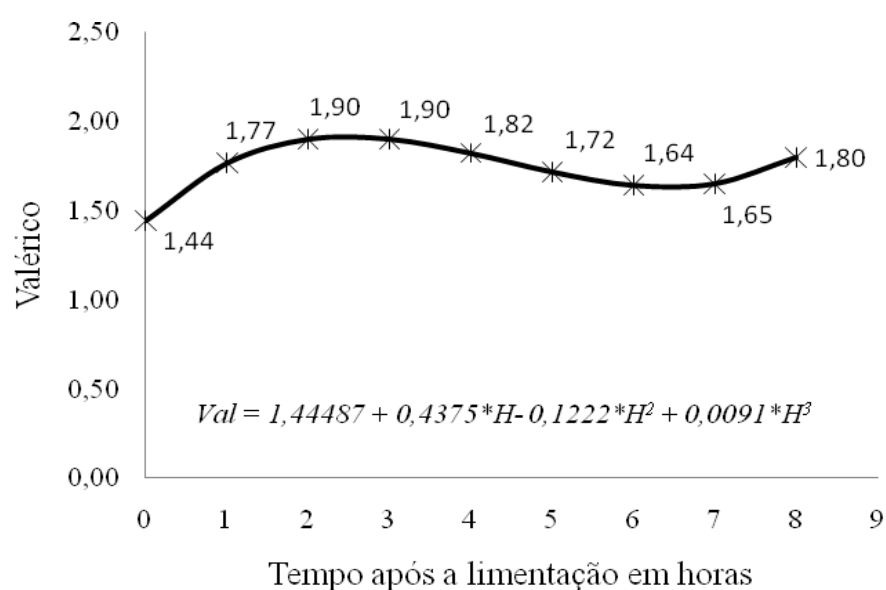


Figura 2 – Concentração de ácido graxo volátil valérico em µM/mL do líquido ruminal nas diferentes dietas

Observou-se também um pH mais elevado para o aditivo LLOSC1+, este ambiente mais tamponado pode ter favorecido o crescimento de bactérias formadoras de acetato e inibido as formadoras de propionato, as quais necessitam de um ambiente mais ácido para se desenvolverem (Stradiotti Jr. et al., 2004b).

Na dinâmica ruminal da fase líquida e a cinética das frações sólidas no trato gastrointestinal, não houve efeito da dieta  $P(>0,05)$  em nenhum dos parâmetros avaliados (Tabela 5).

A taxa de passagem de sólido e de líquido é influenciada quando se altera a razão volumoso:concentrado (Poncet, 1991) e o consumo da dieta, aumentando-se

positivamente com o consumo e a proporção de volumoso (Valadares e Pina, 2006). A dieta utilizada apresentou a mesma razão volumoso:concentrado diferindo somente pela adição dos aditivos e não ocorreu diferença entre os consumos, o que pode explicar valores semelhantes para as taxas de passagem de sólido e líquido.

Obteve-se em média uma taxa de passagem de 13,11%/hora, esse valor encontra-se acima dos relatados por Maeda (2007) de 12,2%/hora e Souza et al. (2009) de 9,6%/hora em bubalinos alimentados, respectivamente, com dietas à base de silagem de cana-de-açúcar com 60:40 volumoso:concentrado e um consumo de 1,48% PC e dieta com 95% de volumoso à base de cana-de-açúcar e um consumo de 0,90% PC.

Tabela 5 – Dinâmica ruminal da fase líquida e cinética das frações sólidas no trato gastrointestinal nas diferentes dietas

	Dieta <sup>1</sup>				P <sup>2</sup>	EP <sup>3</sup>	CV <sup>4</sup>
	Controle	LLOSC1	LLOSC1+	LLOSB3+			
KI (%/hora) <sup>5</sup>	13,33	12,62	14,28	12,19	0,780	0,64	19,62
TR de líq. (horas) <sup>6</sup>	7,54	8,03	7,43	8,56	0,785	0,36	18,64
TRec de líq. (vezes/dia)	3,20	3,03	3,43	2,92	0,780	0,15	19,62
Taxa de F de líq.(L/hora)	10,85	10,47	10,74	9,95	0,711	0,34	13,25
Volume Ruminal (L)	81,88	84,22	78,23	83,54	0,939	3,36	16,40
Volume Ruminal (L) <sup>7</sup>	72,06	66,76	71,83	70,15	0,421	1,25	7,11
Volume Ruminal (%PV) <sup>8</sup>	15,34	15,91	15,72	15,53	0,987	0,59	15,20
Volume Ruminal (%PV) <sup>9</sup>	13,47	12,60	13,41	13,01	****	0,29	9,14
MS Ruminal (kg)	10,89	10,45	10,99	10,71	0,948	0,70	12,94
MS Ruminal (%)	15,11	15,60	15,32	15,29	0,985	0,93	12,14
Kp de sólidos (%/horas)	1,23	1,12	1,09	1,09	0,558	0,08	13,34
Kd de sólidos (%/horas)	2,21	2,16	2,12	2,06	0,859	0,12	11,69
Kt de sólidos (%/horas)	3,30	3,29	3,28	3,21	0,986	0,19	11,68
TR de sólidos (horas)	31,39	31,30	31,26	30,46	0,987	2,05	13,21

Médias na mesma linha, seguida de letras diferentes, diferem estatisticamente pelo teste de Tukey e a 10% como tendência; <sup>1</sup>LLOS: produto à base de extrato de própolis que diferiram na concentração de flavonoides totais (LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+); <sup>2</sup>Probabilidade; <sup>3</sup>Erro padrão; <sup>4</sup>Coefficiente de Variação; <sup>5</sup>KI: Taxa de passagem de líquidos; <sup>6</sup>Taxa de retenção; <sup>7</sup>Estimado a partir do esvaziamento ruminal; <sup>8</sup>Estimado a partir do volume ruminal do Co-EDTA; <sup>9</sup>Estimado a partir do volume ruminal do esvaziamento ruminal; TRec: Taxa de reciclagem; Kp: Taxa de passagem, calculado através do volume ruminal do Co-EDTA.

Os valores observados de taxa de reciclagem de 3,15 vezes ao dia encontram-se um pouco abaixo aos observados por Nogueira Filho (2004), de 3,85 vezes ao dia, em bubalinos com consumo de 10,6 kg, de MS de uma dieta à base de feno de capim coast-

cross (*Cynodon dactylon* (L) Pers) e concentrado (65:35% de volumoso:concentrado). Menores consumos, como observado (8,4 kg de MS) resultam em menor taxa de reciclagem.

A taxa de fluxo de líquido apresentou uma média de 10,50 L/hora, estando acima dos valores observados por Prado et al. (2010c), que obteve 8,0 L/hora em bubalinos alimentados com dieta à base de silagem de milho e feno (70% de silagem de milho, 10% de feno de Tifton e 20 % de concentrado). Dietas mais secas acarretam numa salivação mais intensa, resultando em maior taxa de fluxo.

Verificam-se que os dados de volume ruminal obtidos pela metodologia da diluição do cobalto foram em média 11,8 L superior àquele medido pelo esvaziamento. A média de volume ruminal variou, respectivamente, de 15,6% e 13,12% do PC. Este último valor está próximo dos valores relatados em bubalinos por Franzolin et al. (2002) de 13,61% do PC com 70% de FDN na dieta e por Prado et al. (2010c) de 13,85% do PC em bubalinos alimentados com dietas com 80% de forragem.

A percentagem média de matéria seca ruminal foi de 15,33% e encontra-se dentro do intervalo preconizado por (referencia) de 15 a 19% de matéria seca.

A taxa de passagem de sólidos com média de 1,13%/hora é considerada baixa pelo ARC (1984), que preconiza uma taxa de passagem de sólidos de 2,0%/hora, para bovinos em manutenção. Terramoccia et al. (2000) encontrou valor de 2,42%/hora em dieta com relação 75:25% volumoso:concentrado em bubalinos. A baixa taxa de passagem de sólidos observada pode estar associada a qualidade da forragem utilizada e ao baixo consumo. A taxa de digestão de sólidos teve uma média de 2,14%/hora, este valor está abaixo do observado por Nocek e Grant (1987), que foi de 3,0%/hora trabalhando com *Dactylis glomerata* L.

O tempo de retenção de sólidos foi em média de 31,10 horas. Martins et al. (2006) com bovinos em dieta contendo 68% de feno de Tifton 85, encontrou valores de retenção de sólidos de 38,56 horas.

A síntese de proteína microbiana (g/dia) e a eficiência de síntese de proteína microbiana (g/100g de NDT) não tiveram efeito das dietas ( $P>0,05$ ). Com valor médio de 9,85 g/100g de NDT (Tabela 6). Este valor encontra-se acima dos observados por Dipu et al. (2006) que foi de 2,91 g/100g de NDT para bubalinos com 297 kg e ingerindo 95% do consumo voluntário (4,75 kg de MS/dia e 1,60% PC) alimentados com dieta à base de palha de trigo e concentrado com razão 40:60 volumoso:concentrado.

Tabela 6 - Síntese de proteína microbiana e eficiência de síntese microbiana (g PBmic/100 g de NDT) nas diferentes dietas

Variável	Dieta				Médias	P <sup>2</sup>	EP <sup>3</sup>	CV <sup>4</sup>
	Controle	LLOSC1	LLOSC1+	LLOSB3+				
VU (L)	23,77	20,04	21,46	28,13	24,11	0,302	2,31	19,17
	Derivados de purinas na urina							
ALA	76,54	77,61	85,74	80,82	80,18	0,753	6,47	16,13
AcU	0,65	0,77	0,79	0,72	0,73	0,964	0,22	60,48
PUT	77,18	78,38	86,53	81,55	80,91	0,757	6,58	16,27
ALA (%)	99,18	99,11	99,04	99,17	99,12	0,968	0,22	0,456
AcU (%)	0,82	0,89	0,96	0,83	0,88	0,968	0,22	51,64
PuAb	86,69	88,42	99,32	92,49	91,73	0,762	8,94	19,48
Nmic	63,02	64,28	72,21	67,24	66,69	0,762	6,50	19,48
SBPmic	393,88	401,75	451,28	420,23	416,79	0,762	40,61	19,48
EPBmic	9,84	9,36	9,93	10,28	9,85	0,951	1,15	23,46

Médias na mesma linha, seguida de letras iguais, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% e a 10% como tendência; <sup>1</sup>LLOS: produto à base de extrato de própolis que diferem na concentração de flavonoides totais (LLOSB3+, LLOSC1, LLOSC1+); <sup>2</sup>Probabilidade; <sup>3</sup>Erro padrão; <sup>4</sup>Coefficiente de Variação; VU: Volume urinário; ALA: alantoína (mmol/dia); AcU: ácido úrico (mmol/dia); PUT: purinas totais. (mmol/dia); ALA% e AcU%: % do total de purinas; Puab: Purinas microbianas absorvidas (mmol/dia); Nmic: Compostos nitrogenados microbianos (g/dia); SBPmic: Síntese de proteína microbiana (g/dia); EPBmic: Eficiência de síntese microbiana (g PBmic/100g de NDT)

Maiores valores de eficiência de síntese de proteína microbiana de 11,80 e 13,25 g/100g de NDT foram observados por Aguiar (2009) em animais confinados que recebiam dietas 50:50% com adição de LLOSC1 e LLOSC1+ e consumiram 2,45% do PC. A dieta utilizada no experimento apresentava razão 70:30 de volumoso:concentrado considerada ideal para o crescimento microbiano máximo, por causa das melhores condições de pH, taxa de passagem e condição de colonização (Sniffen e Robinson,1987), mesmo assim apresentou valores considerados abaixo do ideal pelo NRC (1996), que é de 12,8 g/100g de NDT para dietas com mais de 40% de forragem, fornecidas a bovinos.

A excreção de alantoína e ácido úrico não apresentaram efeito das dieta ( $P>0,05$ ), as proporções de alantoína e ácido úrico foram de 99,12% e 0,88%, respectivamente, estas proporções estão fora dos valores encontrados por Dipu et al (2006) de 91,46 e 8,54%; Chen et al. (1996) de 90,64% e 9,36%; Cutrignelli (2007) de 84,73% e 11,57% de alantoína e ácido úrico, respectivamente. Chen & Gomes (1992) afirmam que no mesmo animal, as proporções de alantoína são muito constantes, mas parece haver variação entre os animais.

### **Conclusões**

Entre os produtos à base de própolis destaca-se o LLOSC1, com menor concentração em flavonoides totais, pois propicia melhor valor nutricional de dietas à base de forragem, fornecidas a bubalinos.

### Referências

- AGRICULTURAL RESEARCH COUNCIL (ARC). 1984. The Nutrient Requirements of Ruminant livestock, Supplement no. 1. Slough: Commonwealth Agricultural Bureaux.
- AGUIAR, S. C. de. **Produtos à base de própolis (LLOS) na dieta de bovinos mestiços não castrados em confinamento**. Maringá, PR: UEM, 2009. 58p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, 2009.
- AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N. et al. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.29, n.2, p.1006-1010, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 13 ed. Washington, D.C.: **Association of Analytical Chemistry**. 1980. 1015p.
- BAYAT, A. R.; RINNE, M.; KHALILI, H.; VALIZADEH, R.; HUHTANEN, P. Estimation of digesta kinetics of different particle size fractions using rumen evacuation technique in dairy cows fed red clover-grass silage. **Journal Animal Feed Science**, v.16: 538-554. 2007.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, 2007.
- CHEN, B.X.; SAMARAWEERA, L.; KYLE, D.J.; et al. Urinary excretion of purine derivatives and tissue xanthine oxidase (EC 1.2.3.2) activity in buffaloes (*Bubalis bubalis*) with special reference to differences between buffaloes and *Bos Taurus* cattle. **British Journal of Nutrition**, v.15, p.397-407, 1996.
- CHEN, X.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details. **Bucksburn: Rowett Research Institute**, 1992. 21p. (Occasional publication).
- COELHO DA SILVA, J. F; Mecanismos reguladores de consumo. In: Telma Teresinha Berchelli; Alexandre Vaz Pires; Simone Gisele de Oliveira. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2006, v. 1, p. 151-182.
- COELHO DA SILVA, J.F.; LEÃO, M.I. **Fundamentos de nutrição de ruminantes**. Piracicaba, S.P, Livroceres. 1979. 380p.

- COLUCCI, P. E.; MACLEOD, G. K.; GROVUM, W. L.; *et al.* Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. **Journal of Dairy Science**, v.73, n.8, p.2143-2156, 1990.
- COLUCCI, P.E. **Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle.** Guelph:University of Guelph, 1984. 221p.Thesis (Ph.D. Thesis Animal Science) - University of Guelph, 1984.
- CUTRIGNELLI, M.I.; PICCOLO, G.; D'URSO, S.; *et al.* Urinary excretion of purine derivatives in dry buffalo and Friesian cows. **Italian Journal Animal Science**, Vol 6, (suppl. 2), p.563-566, 2007.
- DIPU, M. T.; GEORGE, S. K.; SINGH, P.; *et al.* Measurement of microbial protein supply in Murrah Buffaloes (*Bubalus bubalis*) using urinary purine derivatives excretion and PDC Index. **Asian-Australian Journal of Animal Science**, Vol 19, No. 3,p.347-355, 2006.
- FRANCO, S.L.; BUENO, J.H.F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p.48-51, 1999.
- FRANZOLIN, M.H.T.; SILVEIRA, A.C.; FRANZOLIN, R. Efeitos de dietas com diferentes níveis de fibra em detergente neutro e do tamanho de poros de sacos de náilon incubados no rúmen sobre a fauna ruminal em bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.2, p.716-723, 2002.
- HOOVER, W.H. Chemical factors involved in ruminal fiber digestion. **Journal of Dairy Science**, v.69, n.6, p.2755-2766, 1986.
- HUHTANEN, P.; ASIKAINEN, U.A.; ARKKILA, M. *et al.* Cell wall digestion and passage kinetics estimated by marker and in situ or rumen evacuations in cattle fed 43 hay 2 or 18 times daily. **Animal Feed Science and Technology**, v.133, p206-227, 2007.
- HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes.** ed. Academic Press, New York, p. 533, 1966.
- KEARL, L. Exigências nutricionais dos bubalinos. In: Ramos, A. A (Ed.) **Contribuição aos estudos dos bubalinos.** Botucatu, 2003. p.47-90.
- KIMURA, F.T.; MILLER, V.L. Chromic oxide measurement. Improved determination of chromic oxide in cow feed and feces. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.5, p.216, 1957.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; VAN AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.
- LICITRA, G., HERNANDEZ, T.M., VAN SOEST, P.J.. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p. 347-358. 1996.

- MAEDA, E.M.; ZEOULA, L.M.; GERON, L. J. V. et al. Digestibilidade e características ruminais de dietas com diferentes teores de concentrado para bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.3, p.716-726, 2007.
- MAENG, W.J., BALDWIN, R.L. Dynamics of fermentation of purified diet and microbial growth in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.4, p.636-642. 1976.
- MARTINS, A. DE S., VIEIRA, P. DE F., T. T., BERCHIELLI, et al. Taxa de passagem e parâmetros ruminais em bovinos suplementados com enzimas fibrolíticas.. *Revista Brasileira de Zootecnia.*, v.35, n.3, p.1186-1193, 2006.
- MEHREZ, A.Z.; ØRSKOV, E.R.; McDONALD, I. Rates fermentation in relation to ammonia concentration. **The British journal Nutrition**, v.38, n.3, p.437-443, 1977.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requeriments of beef cattle**, Washington, D.C.: 242p, 1996.
- NOCEK, J. E. AND GRANT, A. L. **Characterization of in situ nitrogen and fiber digestion and bacterial nitrogen contamination of hay crop forages preserved at different dry matter percentages.** *Journal Animal Science*, v.64, p. 552-564. 1987.
- NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; OLIVEIRA, M.E.M. CUNHA, J.A. et al. Volume líquido e taxa de turnover no rúmen de zebuínos e bubalinos submetidos a dietas com volumosos e concentrados e sua relação com protozoários ciliados. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, n.1, p. 1-7, 2004.
- NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: Telma Teresinha Berchelli; Alexandre Vaz Pires; Simone Gisele de Oliveira. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2006, v. 1, p. 151-182.
- OLIVEIRA, A.L. Búfalos: produção, qualidade de carcaça e de carne. Alguns aspectos quantitativos, qualitativos e nutricionais para promoção do melhoramento genético. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n.2, p.122-134, 2005. Disponível em: <[www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)>. Acesso em 10 março 2009.
- OLIVEIRA, S. J.; QUEIROZ, S. A.; LANA, P. R. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos in vitro pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p. 275-281, 2006.
- OWENS FN, BERGEN WG. Nitrogen metabolism in ruminant animals: historical perspective, current understanding and future implications. **Journal Animal Science**. v. 57, p. 498-518 (sup 2), 1983.
- PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3152, 1971.
- PONCET, C. The outflow of particules from the reticule-rumen. In: *Rumen Microbial Metabolism and Ruminant Digestion*. Paris: INRA. 1991. v. 1, p. 297-322.
- PONTARA, L. P. M.; ZEOULA, L. M.; PRADO, O. P. P. et al. Digestibilidade *in vitro* da matéria seca de rações com 100% de volumoso e adição de produtos LLOS à



- base de própolis ou ionóforo. In: 43ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43. João Pessoa, PB, 2006. **Anais...** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, [2006]. (CD ROM).
- PRADO, O. P. P. Produto à base de própolis na nutrição de ruminantes (LLOS). Maringá: Universidade Estadual de Maringá, 2005. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, 2005, 78p.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; PONTARA, L. P. M. et al. Isolation and expeditious morphology, biochemical and kinetic characterisation of propolis-tolerant ruminal bacteria. **Brazilian Journal of Animal Science**, 2010a ; ISSN/ISBN: 15163598.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; PONTARA, L. P. M.; et al. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dieta à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 2010b ; ISSN/ISBN: 15163598.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; PONTARA, L. P. M.; et al. 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**, 2010c ; ISSN/ISBN: 15163598.
- RÍSPOLI, T. B.; RODRIGUES, I. L.; NETO, R. G. M. et al. 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.
- ROBINSON, P.H.; TAMMINGA, S.; Van VUUREN, A.M. Influence of declining level of feed intake and varying the proportion of starch in the concentrate on rumen ingesta quantity, composition and kinetics of ingesta turnover in dairy cows. **Livestock Production Science**, v.17, p.37-62, 1987.
- SAS. Procedures guides. Version 6. Cary [ Estados Unidos ] : SAS. Institute.
- SILVA, D.J. e QUEIROZ, A.C. **Análises de alimentos**. 3.ed. UFV: Imprensa Universitária, 2006. 235p.
- SINGH, S.; PRADHAN, K.; BATHIA, S. K. Relative ruminal microbial profile of cattle and buffalo fed wheat straw-concentrate diet. **Indian Journal Animal Science**, v.62, n.12, p.1197-1202, 1992.
- SIVKOVA, K.; TRUFCHEV, H.; VARLIAKOV, I. Comparative studies on fermentation processes in the rumen and blood content of calves and buffalo calves I. Effect on diet, containing alfafa haylage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 1997, Italia. **Anais...**Itália: 1997. p.312-316.
- SNIFFEN, C. J., O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal. Science**, v. 70, n.11, p.3562-3577, 1992.
- SNIFFEN, C.J., ROBINSON, P.H. 1987. Microbial growth and flow as influenced by dietary manipulations. **Journal Dairy Science**, v.70:425-441.

- SOUZA, N. H. de; FRANZOLIN, R.; SOARES, W. V B. Metabolismo mineral em bubalinos com ingestões de diferentes níveis de fósforo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.6, p.1149-1154, 2009.
- SOUZA, N.H.; FRANZOLIN, R. RODRIGUES, P.M.H. et al. Efeitos de níveis crescentes de fibra em detergente neutro na dieta sobre a fermentação ruminal em bubalinos e bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.5, p. 1553-1564, 2000.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R. P. et al. Ação do extrato de sobre a fermentação in vitro de deferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1093-1099, 2004b.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIRÓZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1086; 2004a.
- TERRAMOCCIA, S.; BARTOCCI, S.; AMICI, A. et al. Protein and protein-free dry matter rumen degradability in buffalo, cattle, and sheep fed diets with different forage to concentrate ratios. *Livestock Production Science*, v.65, p.185-195, 2000.
- TEWATIA, B. S.; BHATIA, S. K. Comparative ruminal biochemical and digestion related physiological characteristics in buffaloes and cattle fed a fibrous diet. **Buffalo Journal**, v.14, p.161-170, 1998.
- TRUFCHEV, H.; SIVKOVA, K.; ZANKOVA, M. Comparative studies on fermentation processes in the rumen and blood content of calves and buffalo calves II. Effect on diet, containing maize silage. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 5. 1997, Italia. **Anais...Italia**: 1997. p.312-316.
- UDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.31, n.7, p.625-632, 1980.
- VAL NETO, E. R. DO. **Ácidos graxos de cadeia ramificada na nutrição de bovinos**. Viçosa, MG: UFV, 2009. 20p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- VALADARES FILHO, S. C.; PINA, D. S. Fermentação ruminal. In: Telma Teresinha Berchelli; Alexandre Vaz Pires; Simone Gisele de Oliveira. (Org). **Nutrição de Ruminantes**. 1 ed. Jaboticabal: Funep, 2006, v. 1, p. 151-182.
- VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. Essex: Elsevier, 1988. p.387-443.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. p. 476.
- 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.

VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídeos em rações para ruminante**. Viçosa, MG:UFV, 1980.98p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1980.

ZICARELLI, L. **Nutrition in dairy buffaloes - Alimentazione della buffala da latte**. Caserta: COPPIA OMAGGIO, 2001. 66P.