

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRODUTO COM COMPOSTOS FENÓLICOS DA PRÓPOLIS  
SOBRE PARÂMETROS DIGESTIVOS E RUMINAIS, E  
POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS EM BUBALINOS

Autor: Eduardo Marostegan de Paula  
Orientadora: Lúcia Maria Zeoula

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
maio – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRODUTO COM COMPOSTOS FENÓLICOS DA PRÓPOLIS  
SOBRE PARÂMETROS DIGESTIVOS E RUMINAIS, E  
POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS EM BUBALINOS

Autor: Eduardo Marostegan de Paula  
Orientadora: Lúcia Maria Zeoula

“Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.”

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
maio – 2013

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

P324p Paula, Eduardo Marostegan de  
Produto com compostos fenólicos da própolis sobre  
parâmetros digestivos e ruminais, e população de  
protozoários em bubalinos / Eduardo Marostegan de  
Paula . -- Maringá, 2013.  
45 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof.a Dr.a Lucia Maria Zeoula.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de  
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-  
Graduação em Zootecnia, 2013

1. Ácidos graxos voláteis. 2. Aditivos. 3.  
Flavonóides. 4. Nitrogênio amoniacal. I. Zeoula, Lúcia  
Maria, orient. II. Universidade Estadual de Maringá.  
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação  
em Zootecnia III. Título.

CDD 21.ed. 634.6

AHS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**PRODUTO COM COMPOSTOS FENÓLICOS DA  
PRÓPOLIS SOBRE PARÂMETROS DIGESTIVOS  
E RUMINAIS, E POPULAÇÃO DE PROTOZOÁRIOS  
EM BUBALINOS**

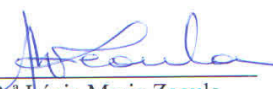
Autor: Eduardo Marostegam de Paula  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lúcia Maria Zeoula

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 24 de maio de 2013.

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Claudete Regina Alcalde

  
Prof. Dr. Raul Franzolin Neto

  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Lúcia Maria Zeoula  
(Orientadora)

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

*Martin Luther King*

A

Deus, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me fortalecendo e me guiando em todos os caminhos percorridos.

Aos

Meus pais, José Assunção de Paula e Aparecida Fátima Marostegan de Paula, pelo amor incondicional, incentivo, apoio nas horas difíceis, e principalmente por serem meu alicerce.

Aos

Meus irmãos, Ana Flavia e Ricardo Marostegan de Paula, pela força, carinho e por torcerem por mim.

À

Minha esposa , Lorryny Galoro da Silva, pela paciência, companherismo em todos os momentos e pelo amor.

Aos

Amigos e familiares,  
pelos momentos de alegria

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação, por viabilizar a realização deste projeto;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos;

À Profa. Dra. Lúcia Maria Zeoula, por sempre me apoiar e acreditar no meu trabalho, pela eterna paciência em acompanhar todas essas etapas, por tantas luzes que me deu, tendo elas uma importância fundamental nos momentos mais decisivos do meu trabalho, por sempre me incentivar a buscar o conhecimento, enfim, obrigado por fazer a diferença em minha vida;

À Profa. Dra. Selma Lucy Franco e Lucimar Pontara Peres, pela parceria e contribuição;

Ao Prof. Dr. Raul Franzolin Neto, pela colaboração no experimento;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pelos conhecimentos repassados e pela dedicação;

Aos meus Pais, José Assunção de Paula e Aparecida Fátima Marostegan de Paula, pelo apoio, incentivo, paciência, pelo amor imenso, carinho constante, confortável força, pelas orações e esforços financeiros;

Aos meus irmãos, Ana Flávia e Ricardo, sempre incentivadores e orgulhosos, também pela grande amizade e apoio;

À minha grande companheira e esposa, Lorryny Galoro da Silva. Essa grande mulher que com sabedoria se aloja no meu coração, obrigado por tanto amor, pela ótima convivência e por me fazer completo;

À minha sogra, Dalva Regina Galoro, por todo incentivo e palavras de carinho;

Ao senhor Durval Pereira de Araujo e a Rosangela Lima pelos conselhos e pelo alegre convívio;

Aos grandes amigos, Rafael Barreiros, Fábio José Maia, Silvia Cristina de Aguiar, Beatriz Lima, Emerson Yoshimura e Carolina Cesarino Coutinho, pelo apoio em todos os momentos, pelos conselhos, pela ajuda. Esta conquista tem muito de vocês que foram meu braço direito nessa caminhada, sou muito grato pela amizade que construímos;

Aos colegas de grupo de trabalho, Érica Machado, Lúcelia de Moura, Bruna Calvo, Hugo Monteiro, Marcelo Estremote, Lígia Lins, Bruno Abreu e Nadine Woruby Santos, pela alegre convivência, pelas sugestões e por toda a ajuda que foram essenciais ao desenvolvimento desse trabalho;

Aos Amigos e funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, Ezupério Salim e José Carlos da Silva, pela amizade e alegria;

Aos funcionários do Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal da Universidade Estadual de Maringá, Creuza Azevedo, Cleuza Volpato e Hermógenes Augusto de C. Neto;

Aos funcionários da secretaria da Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, Denílson Vicentin e Rosi Pepinelli, pelos serviços prestados;

E, finalmente a Deus por sempre me iluminar e me guiar nos bons e maus momentos.

Muito Obrigado!



## BIOGRAFIA

EDUARDO MAROSTEGAN DE PAULA, filho de José Assunção de Paula e Aparecida Fátima Marostegan de Paula, nasceu em 02 de novembro de 1986, em Santa Rosa de Viterbo, São Paulo.

No ano de 2006, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual de Maringá - UEM, no campus da cidade de Maringá – Paraná.

Em dezembro de 2010, cumpriu as exigências para obtenção do título de “Zootecnista” pela mesma Universidade.

Em 2011, iniciou o curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, realizando estudos na sub-área de Nutrição de ruminantes.

No ano de 2012, realizou um estágio de 6 meses na University of Wisconsin, Madison, trabalhando em diversos experimentos com vacas leiteiras.

Em Maio de 2013, submeteu-se à banca examinadora para a defesa da presente Dissertação.

## ÍNDICE

Página	
LISTADE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO .....	11
Referências.....	20
OBJETIVOS GERAIS .....	23
CAPÍTULO II - Produto com composto fenólicos da própolis sobre parâmetros digestivos e ruminais, e população de protozoários em bubalinos .....	
Resumo.....	24
Abstract .....	25
Introdução .....	26
Material e Métodos.....	27
Resultados e Discussão.....	33
Conclusão .....	42
Referências.....	43

## LISTA DE TABELAS

## Página

Tabela 1. Composição Bromatológica e percentual dos alimentos e dieta experimental .....	28
Tabela 2. Composição em flavonoides e ácidos fenólicos identificados no produto à base de própolis LLOS C1, em diferentes processos de secagem, liofilização e spray-dryer.....	29
Tabela 3. Ingestão de matéria de seca e demais nutrientes das dietas.....	34
Tabela 4. Digestibilidade total da matéria seca e demais nutrientes das dietas.....	35
Tabela 5. Dinâmica da fase líquida e sólida no trato gastrointestinal, de bubalinas alimentadas com dieta à base de forragem, com adição de níveis de flavonoides .....	36
Tabela 6. Valores médios dos ácidos graxos voláteis, pH, nitrogênio amoniacal, razão acetato:propionato em dieta com produtos à base de própolis. ....	37
Tabela 7. Contagem de protozoários ciliados no rumen de dieta com produto à base de própolis .....	40
Tabela 8. Síntese de proteína microbiana e eficiência de síntese microbiana.....	42

## LISTA DE FIGURAS

## Página

Figura 1. pH do líquido ruminal em função de horas após a alimentação. ....	37
Figura 2. Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) mg/100 mL no líquido ruminal em relação do tempo após a alimentação, em função das dietas. ....	38
Figura 3. Concentração de ácidos graxos voláteis (mmol/mL) e razão acetato/propionato no líquido ruminal em função de horas após a alimentação. ....	39

## CAPÍTULO I INTRODUÇÃO

### Aditivos alimentares na nutrição de ruminantes

O rúmen possui um ambiente com temperatura (39°C), pH (entre 5,5 - 7,0) controlados, anaerobiose, além de um suprimento de substrato constante. Essas características fazem do rúmen uma excelente câmara de fermentação. Os ruminantes são dependentes dos produtos dessa fermentação proporcionada pelos microrganismos ruminais, para a maioria dos seus nutrientes, e os nutricionistas têm procurado modificar ou manipular essa fermentação com o uso de aditivos, objetivando melhorar a eficiência produtiva do animal hospeiro.

Aditivos são ingredientes com ou sem valor nutricional que, ao serem fornecidos aos animais, irão promover aumentos metabólicos digestivos, auxiliando no incremento produtivo (Berchielli & Bertipaglia, 2010), melhorando os processos benéficos, como aumento da digestibilidade da fibra, fermentação do lactato e conversão dos compostos nitrogenados não-protéicos em proteína microbiana e minimizando os processos ineficientes, como a produção de metano, degradação da proteína e absorção de amônia (Nagajara et al., 1997).

Existem diversos tipos de aditivos alimentares com potencial para manipular a fermentação ruminal dentre eles podemos usar como exemplos os antibióticos ionóforos que, provavelmente são os aditivos mais pesquisados em dietas para ruminantes, porém em 2003, foi criada na União Européia a Autoridade Européia da Segurança do Alimento (EFSA), responsável pela regulamentação do uso de aditivos na nutrição animal e pela proibição do uso de antibióticos (Regulamentação da EC 1831/2003) nas rações.

A razão pela proibição do uso de ionóforos foi que, resíduos desses antibióticos na carne e leite, podem gerar resistência de bactérias ao uso de antibióticos, entretanto não há confirmação na literatura de trabalhos que tenham sido encontrados resíduos de

ionóforos na carne e leite dos animais alimentados com tais substâncias. De qualquer forma, a União Européia prefere adotar a lei da 'Precaução', já que o uso de antibióticos na produção animal é considerado pela Organização Mundial de Saúde um risco crescente para a saúde humana. Em 1<sup>o</sup> de janeiro de 2006 na União Européia, foi proibido o uso dos aditivos ionóforos.

Nesse contexto, pesquisadores têm buscado alternativas aos antibióticos usados como aditivos na produção animal. Como substâncias alternativas destacam-se os probióticos ou aditivos microbianos, os ácidos orgânicos e os extratos de plantas, pois caso esses aditivos promovam um melhor aproveitamento da dieta oferecida aos animais, eles também podem diminuir o risco de resíduos nos tecidos e no leite dos animais, garantindo maior segurança e qualidade aos alimentos.

Estudos de Burdock, (1998) e Banskota et al, (2001) têm mostrado que a própolis possui atividades farmacológicas como: antibacteriana, antifúngica, antiinflamatória, antioxidante e anti-carcinogênica, e, caso provado sua ação antimicrobiana contra microrganismos ruminantes ela pode vir a ser utilizado nas dietas de ruminantes como aditivo. Porém, há alguns questionamentos quanto à padronização do produto, em razão da obtenção da matéria-prima e a extração dos princípios ativos.

Nesse sentido, pesquisadores da Universidade Estadual de Maringá vêm trabalhando com uma equipe multidisciplinar, tentando obter meios de padronizar a própolis e esclarecer melhor suas propriedades biológicas, tornando-a assim viável para ser utilizada como um aditivo alimentar na dieta de ruminantes.

### Própolis e sua ação antimicrobiana

A própolis é um complexo material resinoso produzidos pelas abelhas, extraído de diversas partes das plantas, como brotos, botões florais e exsudatos resinosos, segundo Kusumoto et al. (2001). Após coletado, esse material é enriquecido com secreções salivares e enzimas da abelhas, de acordo com Bankova et al. 2000 e é usado para cobrir a parede das colméias, vedar frestas e embalsamar insetos invasores. Ela também é responsável pela segurança da colméia, especialmente contra microrganismos (Bosio et al. 2000).

Sua composição básica apresenta cerca de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen, além de microelementos como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas

B1, B2, B6, C e E (Ghisalberti, 1979). Essa proporção pode variar dependendo do local e a época de coleta segundo Marcucci, (1995). Dentre esses compostos, sabe-se da presença de ácidos graxos e compostos fenólicos (incluindo ácido cinâmico e ácido cafeico) e seus ésteres, aldeídos aromáticos, álcoois, sesquiterpenos, naftalenos e flavonóides.

A ação contra microrganismos é uma das principais características da própolis, e ela vem sendo usada desde a antiguidade pelos seres humanos devido suas propriedades farmacológicas. Diversos autores já comprovaram sua ação antibacteriana, antifúngica e antiviral, além de outras propriedades como antiinflamatória, anticarcinogênica, cicatrizante, anestésica, imunomodulatória, anticariogênica e hipotensiva (Marcucci, 1995; Burdock, 1998; Park, 2002).

O modo de ação da própolis como agente antimicrobiano não está completamente elucidado.

Alguns autores acreditam que a complexa composição da própolis é a principal razão de sua atividade antimicrobiana e, devido a essa complexidade, o seu modo de ação como agente antimicrobiano não está completamente elucidado. A dificuldade de encontrar uma explicação concreta do modo de ação da própolis, ocorre devido a sua heterogenidade. Já foram identificados mais de 300 constituintes em diferentes amostras de própolis (Burdock, 1998).

Segundo Takaisi-Kikuni & Schilder. (1994), provavelmente os constituintes da própolis como flavona pinocembrina, flavonol galangina e o éster feniletil do ácido cafeico, agem na inibição da RNA-polimerase bacteriana. Outra hipótese seria que a própolis possui a capacidade de desorganizar o citoplasma, a membrana plasmática e a parede celular, causando uma parcial bacteriólise e assim inibindo a síntese de proteína da célula bacteriana. Mirzoeva et al. (1997) concluíram que a própolis possui ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém, as bactérias Gram-negativas são mais tolerantes à própolis. Segundo Scazzocchio et al. (2006) flavonóides e os ácidos caféico, benzóico e cinâmico, provavelmente agem na membrana da parede celular do microrganismo, causando danos estruturais e funcionais.

Pesquisas têm comparado a ação antimicrobiana, antiinflamatória, antifúngica da própolis de diferentes regiões geográficas. É conhecido que própolis de diferentes regiões apresentam composição química diferentes, devido à diversidade da flora que é utilizada pelas abelhas no preparo da própolis. Bankova, (2005) comparou a ação antibacteriana de 3 grupos de própolis: Européia, Brasileira e da América Central.

Os resultados mostraram que à própolis Européia e Brasileira apresentam semelhantes atividade antimicrobianas, apesar da composição química entre elas ser diferentes.

Com o mesmo objetivo, Kujumgiev et al. (1999) compararam própolis de diferentes regiões geograficas, e também, apesar das diferenças na composição química das amostras, todas apresentaram atividade antimicrobiana, antifungica e antiviral. Esses estudos demonstram claramente que diferentes combinações de substâncias são essenciais para a atividade biológica da própolis. Os flavonóides são os componentes da própolis mais estudados, porém, eles não são os únicos responsáveis pelas suas propriedades farmacológicas.

Além dos flavonoides, os ácidos fenólicos são exemplos de compostos da própolis com propriedades medicinais Awale et al. (2005). Os principais ácidos fenólicos encontrados na própolis brasileira são: ácido cinâmico e derivados (ácido caféico, ácido p-cumárico, drupanina, bacarina, entre outros), ácido benzóico, ácido 3-prenil-hidroxicinâmico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido trans-cinâmico, éster fenetil do ácido caféico (CAPE) e Artepelin C, segundo Park et al. (2002).

Diante do exposto fica claro que independente da região geográfica em que a própolis é produzida, ela possui ação antimicrobiana, principalmente contra bactérias Gram-positivas e os maiores desafios para futuras pesquisas será encontrar um método de padronização do produto para que ele se torne uma alternativa viável, tanto para a medicina humana ou animais como também sua utilização como aditivo alimentar.

## Uso da própolis em Ruminantes

Na ultima década, observou-se um aumento em pesquisas com extrato de própolis na dietas de ruminantes como uma alternativa aos antibióticos ionóforos, em consequência da proibição do seu uso na União Européia desde 2006. Na literatura, são encontrados inúmeros resultados que mostram a ação antimicrobiana da própolis, principalmente contra as bactérias Gram-positivas segundo Grange & Davey (1990); Mirzoeva et al. (1997); Dobrowolski et al. (1991). Em função disso, à própolis vem sendo investigada com o objetivo de melhorar o desempenho produtivo dos animais.

Avaliando a ação *in vitro e in vivo* da própolis (30% de própolis em álcool 70% ou 99,6%) sobre a atividade específica de produção de amônia (AEPA) e a fermentação ruminal, Stradiotti Jr et al. 2004a observaram que a adição da própolis inibiu a AEPA



tanto *in vitro* como *in vivo*, e aumentou a produção de AGV totais. Em outro trabalho, Stradiotti Jr. et al. (2004b), avaliando a eficiência da própolis em diminuir a produção de gases de três razões volumoso:concentrado, observou que a própolis foi eficiente em inibir a produção de gases pelos microrganismos ruminais, além de possibilitar aumento da taxa de digestão específica dos carboidratos.

Com o objetivo de avaliar *in vitro*, a fermentação da proteína de três fontes de nitrogênio (tripticase, farelo de soja e farinha de peixe), com ou sem adição de própolis, Oliveira et al. (2004) observaram que a própolis foi eficiente em reduzir a produção de amônia de fontes de proteína de maior degradabilidade. E também, a própolis foi mais eficiente que a monensina e a dieta controle, em manter maiores concentrações de proteína solúvel no início das incubações, pela redução da atividade de desaminação.

Ozturk et al. (2010) também observaram uma redução na concentração de amônia ruminal *in vitro*, avaliando duas concentrações de extrato de etanólico de própolis comparada com o tratamento sem adição de própolis. Entretanto, não foram observadas diferenças na produção dos ácidos graxos voláteis. Concordando com esses resultados, Oeztuerk et al. (2010) investigaram o efeitos dos extrato etanólicos da própolis *in vitro* sobre os parâmetros de fermentação ruminal de dieta na razão 60:40 volumoso:concentrado, usando a técnica de simulação ruminal, eles observaram uma redução na concentração de amônia ruminal, porém a própolis não interferiu nas concentrações de ácidos graxos voláteis.

Lana et al. (2005) observaram que adição de óleo de soja na presença de extrato de própolis reduziram no consumo de matéria seca e fibra em detergente neutro, aumentaram os teores de gordura, proteína, sólidos totais no leite de cabras e no pH, e uma redução na razão acetato:propionato do líquido ruminal. Quando foi administrado na dieta, apenas o extrato de própolis, houve pouca interferência no consumo, digestibilidade, produção e composição do leite e nos parâmetros de fermentação. Em trabalho posterior, Lana et al. (2007) avaliaram a inclusão de níveis de óleo de soja e extratos de própolis, sobre o consumo de matéria seca e demais nutrientes, e os parâmetros de fermentação ruminal de cabras leiteiras, e não encontraram diferenças para as variáveis estudadas.

Trabalhando com vacas leiteiras, Stelzer et al. (2009) não observaram efeito na adição de própolis nas rações no nível 30% p/v (30 g de própolis bruta moída a cada 100 mL de álcool a 70% em água) sobre consumo, digestibilidade e desempenho de vacas produzindo acima de 20 kg de leite/dia. Por outro lado, Freitas et al. (2009)

observaram que a adição de extrato etanólico de própolis aumentou a produção de leite e teores de proteína, não apresentando efeito na ingestão de matéria seca, teor de gordura e contagem de células somáticas.

Avaliando o desempenho de cordeiros confinados em terminação, Ítavo et al. (2011), testaram as adições de própolis verde (67,0 mg de flavonóides/animal/dia), própolis marron (20,2 mg de flavonóides/animal/dia) ou monensina (30 mg/animal/dia) na dieta com razão volumoso:concentrado 50:50. Embora o maior ganho de peso tenha sido para o grupo controle, a melhor conversão alimentar e eficiência alimentar foi para os animais que continham própolis marron e monensina.

Em todos os trabalhos citados anteriormente, os extratos de própolis foram utilizados na forma líquida, o que dificulta a administração do produto de uma forma prática na ração, e, também os extratos de própolis não continham sua composição química, o que segundo Sforcin & Bankova (2011), pode limitar a comparação e avaliação científica dos resultados.

O termo própolis não tem uma conotação química, ao contrário do nome científico de uma espécie vegetal. Uma planta é caracterizada pelo seu genoma e este genoma eventualmente determina os metabólitos secundários sintetizados pela enzima destas plantas, sendo estes metabólitos responsáveis pelas atividades biológicas de uma determinada espécie. No caso da própolis, ela também contém metabólitos secundários, mas como citado anteriormente, dependendo da região geográfica em que ela é produzida, os metabólitos secundários são diferentes, o que impossibilita a sua padronização, mas não sua utilização.

Tentando minimizar esses problemas, uma equipe multidisciplinar da Universidade Estadual de Maringá, composta por pesquisadores do Departamento de Zootecnia e da Farmácia, desenvolveram um produto à base de própolis em forma sólida (pó). Esses produtos receberam o nome 'fictício' de LLOS, os quais possuem concentrações de própolis (A, B, C e D) e teores alcoólicos crescentes (1, 2 e 3) e têm o pedido de patrimônio intelectual registrado (PI nº 0605768-3).

Prado et al. (2010a) avaliaram os produtos à base de própolis, em quatro concentrações de própolis diferentes (A, B, C e D, em que A é a menos concentrada e D é a mais concentrada) e três teores alcoólicos (1, 2 e 3, em que 1 foi o 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 50:50 volumoso e concentrado e 100% volumoso. Os autores concluíram que em dietas com 50:50

volumoso:concentrado, os combinados LLOS que se destacaram como promissores aditivos foram: LLOS C1, LLOS D1, LLOS C3 e LLOS A2. Em dietas com 100% de volumoso, as melhores combinações foram: LLOS B3 e LLOS C1.

Posteriormente, Prado et al. (2010b) avaliaram a inclusão dos produtos LLOS B3, e LLOS C1, em duas concentrações de própolis (B e C) e duas extrações alcoólicas (1 e 3) e a monensina sódica em dieta à base de forragem para bovinos, e constataram que os produtos reduziram a digestibilidade total da matéria seca, proteína bruta e NDT. O produto LLOS B3 proporcionou menor pH e maiores produção de acetato e AGV totais, em relação à dieta controle e monensina, não diferindo do LLOS C1. Não houve diferença na concentração da amônia ruminal, entretanto, a adição de própolis diminuiu a digestibilidade ruminal da proteína bruta e aumentou o fluxo de proteína para o intestino.

Testando os mesmo aditivos, porém em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem, Prado et al. 2010c observaram maiores valores para a digestibilidade total da matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, carboidratos totais e nutrientes digestíveis totais, aumento no fluxo de proteína e maior digestibilidade nos intestinos, em relação à dieta controle e a monensina sódica com uso de produto à base de própolis LLOSC1. Esses resultados foram confirmados posteriormente por Costa Jr et al. (2012), avaliando digestibilidade total da matéria seca e demais nutrientes de dietas com 70% de volumoso, recebendo os produtos à base de própolis LLOS C1, LLOS C1+ (o dobro da dosagem LLOS C1) e LLOS B3+ (o dobro da dosagem LLOS B3), em bubalinos, constataram que o aditivo LLOSC1 foi superior à dieta controle para a digestibilidade total da matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, fibra em detergente ácido, carboidratos totais e nutrientes digestíveis totais.

Aguiar, (2012) avaliou o efeito de 3 produtos à base de própolis, LLOB1, LLOSC1 e LLOSC3, sobre o consumo, a digestibilidade total e parcial, parâmetros sanguíneos e ruminais e eficiência microbiana em vacas em lactação, e os produtos à base de própolis LLOSB1 reduziram a digestibilidade ruminal da proteína bruta e o LLOSC1 reduziu a produção de amônia ruminal.

Ríspoli et al. (2009) observaram que o produto à base própolis LLOS C1 reduziu a população de protozoários ciliados no rúmen de bubalinos alimentados com dieta 50:50% (volumoso:concentrado). Yaghoubi et al. (2010) avaliaram doses crescentes de flavonoides totais (0, 17, 35, 70 e 140 µg/mL do fluido de cultura) provenientes de

extrato de própolis e incubaram em meios de cultura, com diferentes razões volumoso:concentrado (100, 50 e 20% de volumoso). As doses de flavonoides, independentemente da razão volumoso/concentrado, reduziram linearmente a produção de gases, número de protozoários, digestão da fibra em detergente ácido e pH do meio. E ainda, as duas maiores doses de flavonoides (70 e 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) reduziram a concentração de amônia.

Em experimentos com bovinos confinados, Aguiar et al. (2012) avaliaram o efeito de produtos à base de própolis LLOS, sobre o desempenho, digestibilidade, produção microbiana e características de carcaça. Os produtos à base de própolis não afetaram nenhuma das variáveis estudadas. Por outro lado, Zawadzki et al.(2011) também avaliando o produto LLOS, porém em uma maior concentração de própolis, observaram um ganho médio diário 26% superior e a eficiência alimentar 25% em relação à dieta controle.

Fica evidente que os extratos à base de própolis agem de alguma forma no ambiente ruminal, inibindo a ação dos microrganismos, e, conseqüentemente, modificando os padrões de fermentação. Entretanto são necessários mais trabalhos testando diferentes dosagens afim de se obter uma quantidade que reflita no desempenho produtivo do animal.

## Protozoários e sua importância no rúmen

O verdadeiro papel da população de protozoários no rúmen ainda não está claro, e eles podem variar com a espécie animal, sistema de alimentação e condições ambientais segundo Franzolin et al. (2010).

Os protozoários representam cerca de 40 a 60% da biomassa microbiana total rúmen (Dehority & Orpin, 1997), e compõe cerca de 31% da proteína de origem microbiana (Punia & Leibholts, 1984). As concentrações de protozoários variam conforme o tipo da dieta e qualidade da mesma, assim como a frequência com que o animal é alimentado, estado fisiológico, e a raça dos animais (Hungate, 1996).

Eles exercem uma importante função na degradação da fração fibrosa dos alimentos que chegam no rúmen, sendo responsáveis por 34% da digestibilidade da fibra, e, segundo Jouany et al. (1988) o decréscimo na população de protozoários frequentemente está relacionado com uma menor digestibilidade da fibra. Os principais

substratos utilizados pela fauna ruminal como fonte de energia são os açúcares e amidos, que são assimilados rapidamente e estocados na forma de amilopectina ou amido protozoário (Willians, 1986). Portanto, os protozoários desempenham um efeito tamponante, pois as bactérias não tem acesso a uma quantidade excessiva de substratos prontamente fermentáveis.

Segundo Forsberg et al. (1984) os protozoários possuem atividade das enzimas proteases, peptidases e deaminases, portanto, eles degradam a proteína da dieta, além disso, eles consomem bactérias e estudos *in vitro* indicaram que eles são os principais contribuintes para o retorno da proteína microbiana no líquido ruminal, o que aumenta a concentração de N-NH<sub>3</sub>.

Estudos com extratos etanólicos da própolis, mostraram que esta apresentou efeito inibitório sobre os protozoários avaliados (Grange & Davey, 1990; Castaldo & Capasso, 2002; Webster, 1990); entretanto, há poucos relatos na literatura sobre a ação da própolis em populações de protozoários ciliados no rúmen. Rísoli et al. (2009), adicionando aditivo à base de própolis LLOS C1 em dietas com 50% de volumoso fornecida para bubalinos, observaram uma redução na população de ciliados do gênero *Entodinium* em relação à dieta sem adição de aditivo. Yaghoubi et al. (2010) avaliaram doses crescentes de flavonóides totais (0, 17, 35, 70 e 140 µg/mL do fluido de cultura) provenientes de extrato de própolis e incubaram em meios de cultura, com diferentes proporções volumoso:concentrado (100, 50 e 20% de volumoso). As doses de flavonóides, independentemente da proporção volumoso:concentrado, reduziram linearmente o número total de protozoários.

Verifica-se a necessidade de mais pesquisas para nos permitir um melhor entendimento do seu papel na fermentação ruminal, e partir de resultados conclusivos encontrar implicações que possam aumentar a produtividade animal.

## Referências

- AGUIAR, S. C.; ZEOULA, L. M.; PONTARA, L. Performance , digestibility, microbial production and carcass characteristics of feedlot young bulls fed diets containing propolis. **Acta Scientiarum Animal Science**, v. 34, n. 4, p. 393-400, 2012.
- AGUIAR, S.C. **Quantificação e caracterização dos compostos ativos da própolis e seus efeitos sobre a nutrição e qualidade do leite de vacas e cepas bacterianas do rúmen**. 2012. 126f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- AWALE, S.; SHRESTHA, S. P.; TEZUKA, Y. et al. Neoflavonoids and related constituents from Nepalese propolis and their nitric oxide production inhibitory activity. **Journal of natural products**, v. 68, n. 6, p. 858-64, 2005.
- BANKOVA, V. S. B.; ASTROB, S. L. D. E. C.; ARCUCCIC, M. C. M. Propolis : recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 3, p. 3-15, 2000.
- BANKOVA, VASSYA. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.
- BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy research**, v. 571, n. July, p. 561-571, 2001.
- BERCHIELLI, T.T.; BERTIPAGLIA, L.M.A. Utilização de aditivos na produção de bovinos de corte. In: PIRES, A.V. (Ed). **Bovinocultura de Corte**.Vol.I. FEALQ. Piracicaba. p. 295-330. 2010.
- BOSIO, K.; AVANZINI, C.; D'AVOLIO, A. et al. *In vitro* activity of propolis against Streptococcus pyogenes. **Letters in applied microbiology**, v. 31, n. 2, p. 174-7, 2000.
- BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and chemical toxicology : an international journal published for the **British Industrial Biological Research Association**, v. 36, n. 4, p. 347-363, 1998.
- CASTALDO, F.; CAPASSO, F. Propolis an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, 2002.
- COSTA JR, J. B. G.; ZEOULA, L. M.; FRANCO, S. L. et al. Effect of propolis product on digestibility and ruminal parameters in buffaloes consuming a forage-based diet. **Italian Journal of Animal Science**, v. 11, n. 78, p. 441-448, 2012.
- DEHORITY, B.A.; ORPIN, C.G. Development of, and natural fluctuations in rumen microbial populations. In: HOBSON, P. N., Ed. **The rumen microbial ecosystem**. London : Elsevier Applied Science, 1988. P. 151-183.
- DOBROWOLSKI, J. W.; VOHORAB, S. B.; SHARMAB, K. et al. Antipyretic studies on propolis bee products and. **Journal of ethnopharmacology**, v. 35, n. 35, p. 77-82, 1991.
- FRANZOLIN, R.; ROSALES, F. P.; SOARES. Effects of dietary energy and nitrogen supplements on rumen fermentation and protozoa population in buffalo and zebu cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.3, p.549-555, 2010.
- FREITAS, J. A.; ANTONANGELO, R. P.; RIBEIRO, J. L. et al. Extrato etanólico de própolis na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 2, p. 333-343, 2009.
- FORSBERG, C. W., LOVELOCK, L. K.; KRUMHOLZ, L.; BUCHANAN-SMITH, J. G. Protease activities of rumen protozoa. **Apply Environmental Microbiology**. 47:101-110. 1984.
- GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, n. 3, p. 159-60, 1990.

- GHISALBERTI E. *Bee World* 1979;60:59.
- HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. ed. Academic Press, New York, p. 533, 1966.
- ÍTAVO, C. C. B. F., MORAIS, M. G., COSTA, C., et al. Addition of propolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feedlot. **Animal Feed Science and Technology**, v.165, p. 161–166, 2011.
- JOUANY, J. P.; DEMEYER, D. I.; GRAIN, J. Effect of Defaunation the Rumen. **Animal Feed Science and Technology**. P.229-265, 1988.
- KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y. et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 235-40, 1999.
- KUSUMOTO, T.; MIYAMOTO THIGUCHI, R.; DOI, S.; SUGIMOTO, H.; YAMADA, H. Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 49, n. 9, p. 1207-9, 2001.
- LANA, R. D. P.; MACHADO, M.; CAMARDELLI, L. 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. D. P.; MACHADO, M.; CAMARDELLI, L. 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. 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. **Microbiological research**, v. 152, n. 3, p. 239-46, 1997.
- NAGAJARA, T.G.; CHENGAPPA, M.M. Liver abscesses in feedlot cattle: A review. **Journal Animal Science**, 76:287, 1997.
- OEZTUERK, H.; EMRE, B.; SAGMANLIGIL, V. et al. Effects of Nisin and Propolis on Ruminal Fermentation *in vitro*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 21, n. 9, p. 2752-2758, 2010.
- OLIVEIRA, J. S.; LANA, R. D. 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.
- OZTURK, H.; PEKCAN, M.; SIRELI, M.; FIDANCI, U. R. Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Ankara Univ Vet Fark Derg**, v. 57, n. 5, p. 217-221, 2010.
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; SCAMPARINI, A. R. P. et al. Própolis produzida no sul do brasil , argentina e uruguai : **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, 2002.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. et al. Adição de própolis ou monensina sódica sobre digestibilidade *in vitro* da matéria seca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 11, n. 4, p. 1023-1032, 2010a.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. et al. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 6, p. 1336-1345, 2010b.
- PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. 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**, v. 39, n. 9, p. 2055-2065, 2010c.
- PUNIA, B.S.; LEIBHOLTZ, S. Protozoal nitrogen in the stomach of cattle. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 64 (supl.), p. 24-25, 1984.
- RÍSPOLI, T. B.; RODRIGUES, I. L.; MARTINS NETO, R. G. 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.
- SCAZZOCCHIO, F.; D'AURIA, F. D.; ALESSANDRINI, D.; PANTANELLA, F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v. 161, n. 4, p. 327-33, 2006.
- SFORCIN, J. M.; BANKOVA, VASSYA. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-60, 2011.
- STELZER, F. S.; LANA, R. D. P.; MAURÍCIO, J. et al. Desempenho de vacas leiteiras recebendo concentrado em diferentes níveis, associado ou não a própolis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 7, p. 1381-1389, 2009.
- STRADIOTTI JR, D.; QUEIROZ, A. C; LANA, R. D. 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 JR, D.; QUEIROZ, A. C;LANA, R. D. P. et al. Ação do Extrato de Própolis sobre a Fermentação *in vitro* de Diferentes Alimentos pela Técnica de Produção de Gases. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 33, n. 4, p. 1093-1099, 2004b.
- TAKAISI-KIKUNI, N. B; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Medicine**, v.60, n.2, p222-227, 1994.
- WEBSTER, L. T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections. In: **The pharmacological basis of therapeutics**. 8th ed. Edited by A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Nies and P. Tayler. pp. 999±1007. Pergamon Press, New York.
- WILLIAMS, A. G. Rumen holotrich ciliate protozoa. **Microbiology Reviews**, 50:25, 1986.
- YAGHOUBI, S. M. J; GHORBANI, G. R; RAHMANI, H. R. et al. Flavonoids manipulation of rumen fermentation: An alternative for Monensin? **Agricultural Segment**. e-segments.com/?id=1508. 2010.
- ZAWADZKI, F.; PRADO, I.N.; MARQUES, J.A. et al. Sodium monensin or propolis extract in the diets of feedlot-finished bulls: effects on animal performance and carcass characteristics. **Journal of Animal and Feed Science**, v.20, n.1, p.16-25. 2011.



## OBJETIVOS GERAIS

Avaliar doses de um produto com compostos fenólicos oriundos da própolis, sobre a digestibilidade total, taxa de passagem, parâmetros ruminais e população de protozoários em bubalinas confinadas recebendo dietas à base de silagem de milho.

1       **II - Produto com composto fenólicos da própolis sobre parâmetros digestivos e**  
2                               **ruminais, e população de protozoários em bubalinos**

3  
4       **Resumo** – Objetivou-se avaliar doses de um produto com compostos fenólicos  
5 oriundos da própolis sobre a digestibilidade total, taxa de passagem, parâmetros  
6 ruminais e população de protozoários em bubalinos confinados. Foram utilizadas quatro  
7 búfalas mestiças, com peso corporal médio e desvio padrão de  $543,9 \pm 32,1$  kg em  
8 delineamento quadrado latino 4x4, com quatro dietas e quatro períodos. O produto com  
9 composto fenólicos oriundos da própolis foi fornecido em três doses, perfazendo quatro  
10 dietas experimentais: CON: sem adição de compostos fenólicos; CF16: adição de 16,95  
11 mg/dia de composto fenólicos totais; CF33: adição de 33,90 mg/dia de compostos  
12 fenólicos totais e CF50: adição de 50,85 mg/dia de compostos fenólicos totais. A dieta  
13 continha 80% de volumoso (silagem de milho) e 20% de concentrado, com 8,9% de PB  
14 e 66% de NDT. As dosagens do produto avaliado não influenciaram ( $P>0,05$ ) a  
15 digestibilidade total da matéria seca e demais nutrientes, dinâmica de fase líquida e  
16 sólida do trato gastrointestinal e síntese de proteína microbiana. Entretanto, foi observado  
17 efeito quadrático ( $P<0,05$ ) entre as dietas para a concentração de acetato e as dietas  
18 CF16 e CF33 apresentaram maior concentração de acetato, em relação ao CON e CF50.  
19 Houve redução na concentração de N-NH<sub>3</sub> do líquido ruminal, para as dietas CF16 e  
20 CF50, em relação ao CON. Foi observado um comportamento linear ( $P<0,05$ ) sobre a  
21 população de protozoários ciliados do gênero *Entodinium*, havendo maior redução de  
22 protozoários com o aumento das doses. Conclui-se que os compostos fenólicos da  
23 própolis promoveram redução na população de protozoários ciliados do gênero  
24 *Entodinium* no rúmen de búfalos, e redução na concentração N-NH<sub>3</sub> do líquido ruminal.

25

26 Palavras-Chave: ácidos graxos voláteis, aditivos, flavonoides, nitrogênio amoniacal

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38 **Product with phenolic compounds of propolis on digestive and ruminal parameters**  
39 **and protozoa population in buffaloes**

40  
41 **Abstract** – The objective was to evaluate different doses of a product with phenolic  
42 compounds from propolis on total digestibility, passage rates for liquids and solids,  
43 ruminal parameters and protozoa population in feedlot buffaloes. It was used four  
44 crossbred female buffaloes with average weight of  $543.9 \pm 32.1$  kg in a 4 x 4 Latin  
45 square with four diets and four periods. The product with phenolic compounds from  
46 propolis was provided in three doses, totaling four experimental treatments: CON:  
47 without addition of phenolic compounds; CF16: 16.95 mg of total phenolic  
48 compounds/day; CF33: 33.90 mg of total phenolic compounds/day and CF50: 50.85 mg  
49 of total phenolic compounds/day. The total mixed ration consisted of 80% corn silage  
50 and 20% concentrate, with 8.9% crude protein (CP) and 66% total digestible nutrients  
51 (TDN). The doses of the evaluated product did not influenced ( $P>0.05$ ) total  
52 digestibility of dry matter and nutrients, passage rates for liquids and solids and  
53 microbial protein synthesis. Therefore, it was observed a quadratic effect ( $P<0.05$ ) to  
54 acetate concentration and the diets CF16 e CF33 had a higher concentration of acetate  
55 compared to CON e CF50. There was a reduction in ruminal ammonia nitrogen  
56 concentration to the diets CF16 and CF50 compared to CF0. Linear correlation was  
57 observed ( $P<0.05$ ) on the population of ciliated protozoa of the genus *Entodinium*, with  
58 higher reduction of protozoa with increasing doses. It can be concluded that the  
59 phenolic compounds from propolis promote reduction in the population of rumen  
60 ciliated protozoa of the genus *Entodinium* in buffaloes and reduction of the  $\text{NH}_3\text{-N}$   
61 concentration in the rumen fluid.

62

63 Key-words: additives, ammonia nitrogen, flavonoids, volatile fatty acids

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

## 77 **Introdução**

78

79 O Brasil se destaca como maior produtor de búfalos da América do Sul (Alves,  
80 2009) e, nos últimos anos, tem ocorrido um crescente interesse pelos seus produtos  
81 alimentícios. A principal finalidade da criação é a produção de leite, e a evolução na  
82 captação de leite pelos laticínios do Selo de Pureza (100% leite de búfala) na última  
83 década teve um crescimento acumulado de 20% ao ano (Bernardes, 2010). Assim  
84 verifica-se uma maior intensificação na produção de búfalos. Entretanto a criação de  
85 búfalos no Brasil é caracterizada por sistemas extensivos, tendo como base alimentar as  
86 pastagens para a produção de leite e corte (Bernardes, 2007).

87 Entretanto, altas proporções de alimentos volumosos na dieta de ruminantes,  
88 conduz ao desenvolvimento de microrganismos celulolíticos no rúmen que favorece a  
89 produção de ácido acético e consequente produção de gás metano que pode representar  
90 perdas energéticas na ordem de 10% (Owens & Goetsch, 1988).

91 O uso de aditivos nas dietas para reduzir perdas e tornar o sistema fermentativo  
92 mais eficiente é recorrente nos sistemas de produção de ruminantes. Entretanto, alguns  
93 dos aditivos mais utilizados, os ionóforos, estão proibidos na União Européia como  
94 medida de precaução, desde 1º de janeiro de 2006.

95 A busca por adequação do sistema de produção tem estimulado a pesquisa de  
96 novos aditivos alimentares em substituição aos aditivos sintéticos. Nesse contexto,  
97 destaca-se a própolis como uma alternativa aos aditivos ionóforos, e diversos autores  
98 obtiveram resultados positivos tanto em avaliações *in vitro* como *in vivo* (Oliveira et al,  
99 2004; Prado, et al, 2010; Oeztuerk et al, 2010; Ozturk et al. 2010; Aguiar 2012). As  
100 respostas aos tratamentos com própolis indicam interferência na fermentação ruminal e  
101 atividade antimicrobiana.

102 No entanto, esses trabalhos ainda não apresentaram uma padronização quanto à  
103 concentração de própolis, teor hidroalcoólico usado para a extração dos compostos  
104 ativos e dosagem a ser utilizados na alimentação de ruminantes. Aliado a esses fatos, as  
105 propriedades biológicas da própolis estão diretamente ligadas à sua composição  
106 química, e, segundo Adelman (2000) esta varia com a flora da região e época da  
107 colheita, com a técnica empregada, e até mesmo com a espécie da abelha.

108 Com intuito de caracterizar, padronizar e estabelecer a dose de extrato de  
109 própolis a ser usada nas dietas de ruminantes, pesquisadores da Universidade Estadual  
110 de Maringá, avaliaram produtos à base de própolis, em pó, denominados de LLOS (PI

111 0605768-3) que variavam nas concentrações de própolis e teores hidroalcoólicos usados  
112 para extração dos compostos ativos (Prado et al. 2010a). Dentre os produtos testados, o  
113 LLOS C1 (concentração C de própolis e teor hidroalcoólico 1), foi o que apresentou  
114 melhores resultados quando fornecidos em dietas de bubalinos à base de forragem  
115 (Prado et al., 2010b; Costa Jr. et al. , 2012). Em ambos trabalhos, foram registrados  
116 aumentos na digestibilidade total da matéria seca, dos carboidratos fibrosos e não  
117 fibrosos e nutrientes digestíveis totais.

118 Para maior rendimento na produção dos produtos à base de própolis avaliados, os  
119 pesquisadores da UEM, alteraram o método de secagem, de liofilizados passou a serem  
120 secos em spray dryer. Após a mudança foi detectado variação na concentração de  
121 flavonóides e ácidos fenólicos, o que induziu no presente trabalho avaliar o efeito de  
122 composto fenólicos oriundos do produto LLOS C1, seco em spray dryer, sobre a  
123 digestibilidade total, taxa de passagem, parâmetros ruminais e contagem de protozoários  
124 de búfalas confinadas recebendo dietas à base de volumoso.

125

## 126 **Material e Métodos**

127

128 O experimento foi realizado, no setor de Digestibilidade de Bovideos da Fazenda  
129 Experimental de Iguatemi e no Laboratório de Análises de Alimentos e Nutrição  
130 Animal do Departamento de Zootecnia, Laboratório de Farmacotécnica do  
131 Departamento de Farmácia e farmacologia, todos pertencentes à Universidade Estadual  
132 de Maringá.

133 Foram utilizadas quatro búfalas (*Bubalus bubalis*) com idade média de dois anos e  
134 meio, mestiças, com cânulas no rúmen, peso corporal médio e desvio padrão de 543,9 ±  
135 32,1 kg, mantidas confinadas em baias individuais semi cobertas, com piso de concreto,  
136 providas de bebedouro e comedouro.

137 Os animais foram alimentados com uma dieta na razão de 80% de silagem de  
138 milho e 20% de concentrado que foi formulada de acordo com as recomendações  
139 proposta por Kearl (1982), para conter 66% de NDT e 8,9% de proteína bruta (Tabela  
140 1). As dietas diferiram somente para a inclusão ou não do produto à base de própolis  
141 LLOSC1 em diferentes doses.

142 O produto com composto fenólicos oriundos da própolis foi fornecido em três  
143 doses, perfazendo quatro dietas experimentais: CON: dieta controle sem adição de  
144 compostos fenólicos; CF16: dieta controle mais adição de 16,95 mg/dia de composto  
145 fenólicos totais; CF33: dieta controle mais adição de 33,90 mg/dia de compostos

146 fenólicos totais CF50: dieta controle mais adição de 50,85 mg/dia de compostos  
 147 fenólicos totais. Devido a pequena quantidade de extratos de própolis usada, o fubá de  
 148 milho foi usado como excipiente, de forma que as doses diárias ficassem contidas em  
 149 10g de produto final (Extrato + excipiente). Os aditivos foram adicionados em duas  
 150 doses (5 g) intra-ruminais diariamente no momento do fornecimento da ração,  
 151 previamente pesadas e acondicionadas em papel toalha 100% celulose.

152

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

Item	Composição ( g/Kg de Matéria Seca)							dieta
	MS	MO	PB	EE	FDN	FDA	FDNi	
S. de Milho <sup>1</sup>	300,8	962,9	60,6	25,8	553,4	347,5	138,7	800,0
Milho moído	890,9	993,5	81,4	39,0	112,7	36,9	4,3	58,0
Farelo de trigo	896,2	973,2	159,4	25,8	305,5	86,9	74,0	47,0
Farelo de soja	903,5	943,8	493,8	29,0	149,0	89,9	1,9	80,0
Uréia	1000,0	-	2800,0	-	-	-	-	5,0
Sal mineral		-	-	-	-	-	-	10,0
Total Diet (80:20) <sup>2</sup>	421,5	950,2	89,3	26,3	480,7	291,3	11,4	

154 <sup>1</sup>S. De Milho=Silagem de Milho; <sup>2</sup>Proporção volumoso:concentrado; MS= Matéria seca; MO= Matéria  
 155 orgânica; PB= Proteína bruta; EE= Extrato etéreo; FDN= Fibra em detergente neutro; FDA= Fibra em  
 156 detergente ácido; FDNi= Fibra em detergente neutro indigestível;

157

158 As amostras de própolis foram obtidas do apiário da Fazenda Experimental de  
 159 Iguatemi. O apiário está localizado dentro de uma reserva de eucalipito (*Eucalipitus* sp.)  
 160 cercado por uma mata nativa, com a presença de alecrim-do-campo (*Baccharis*  
 161 *dracunculifolia*).

162 O produto à base de própolis LLOS C1 foi produzido de acordo com metodologia  
 163 desenvolvida por Franco & Bueno (1999) com concentração C de própolis e teor  
 164 hidroalcoólico 1 usado para extração dos compostos ativos e está protegido como  
 165 patrimônio intelectual sob o nº PI 0605768-3. A quantificação dos compostos fenólicos  
 166 presentes nos extratos de própolis LLOS C1 obtidos por diferentes forma de secagem  
 167 (liofolização e spray-dryer) foi realizada através de cromatografia líquida de alta  
 168 eficiência (CLAE). Os ácidos fenólicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido p-  
 169 cumárico, ester fenetil do ácido caféico (CAPE) e artepillin C) foram quantificados em  
 170 ácido p-cumárico (padrão analítico), e os flavonóides (apigenina, pinocembrina, crisina  
 171 e acacetina), foram quantificados em apigenina (padrão analítico) (Tabela 2).

172 Os animais foram pesados no início do período de adaptação e no final do período  
 173 de coleta, para se calcular a quantidade de alimento a ser fornecida, a qual foi fornecida  
 174 a modo de se obter sobras entre 5 a 10%.

175

176 Tabela 2 - Composição em flavonóides e ácidos fenólicos identificados no produto à  
 177 base de própolis LLOS C1, em diferentes processos de secagem, liofilização  
 178 e spray-dryer.

Compostos fenólicos	LLOS C1 <sup>1</sup> (mg/g de extrato seco)	
	Spray-dryer <sup>2</sup>	Liofilizado <sup>3</sup>
Ácido clorogênico	n.d <sup>4</sup>	1,68
Ácido cafeico	22,84	13,2
Acido <i>p</i> -cumárico	39,13	29,68
CAPE	11,82	7,6
Artepilin C	31,95	37,91
Apigenina	6,15	5,66
Pinocembrina	3,94	4,77
Crisina	3,49	4,82
Acacetina	4,81	6,04
<b>Total de compostos fenólicos</b>	<b>124,13</b>	<b>111,36</b>

179 <sup>1</sup>LLOSC1: Produto à base de própolis com concentração C de própolis e teor hidroalcoólico 1; <sup>2</sup>fonte:  
 180 comunicação pessoal; <sup>3</sup>fonte: Aguiar (2012); <sup>4</sup>não detectado

181

182 A ração foi fornecida aos animais duas vezes ao dia, em duas porções iguais, pela  
 183 manhã às 8:00 horas e à tarde 16:00 horas, *ad libitum*, o concentrado e o volumoso  
 184 foram misturados nos cochos. Cada período experimental (quatro) teve a duração de 20  
 185 dias, sendo 14 dias para adaptação dos animais e 6 dias de coletas.

186 As amostras de sobras e alimentos foram amostradas às 8:00 horas, do 15<sup>o</sup> ao 19<sup>o</sup>  
 187 dia de cada período experimental, e em torno de 200 g de fezes foram coletados  
 188 diretamente do reto às 8:00 e às 16:00 horas e congeladas a -20°C para posteriores  
 189 análises de FDNi, matéria seca (MS) e nutrientes.

190 Após descongelamento, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada  
 191 de ar (MA035-MARCONE®) a 55°C por 72 horas, moídas individualmente, em  
 192 moinhos de faca (MA048-MARCONE®), utilizando peneira com crivo de 1 mm, e  
 193 misturadas com base no peso seco, para formar amostras compostas por período e  
 194 tratamento.

195 A taxa de passagem da fase sólida no trato gastrointestinal, foi estimada com  
 196 auxílio do Cromo-FDN ou “Mordente”, fixado à parede celular da silagem de milho,  
 197 segundo a técnica descrita por Udén et al. (1980).

198 Para determinar a curva de excreção de cromo, foi introduzida uma amostra  
 199 marcada de silagem (100 g) diretamente no rúmen, pela fistula ruminal, uma única vez  
 200 antes da primeira alimentação no 15<sup>o</sup> dia de cada período experimental. Após este  
 201 procedimento, foi iniciada a coleta de aproximadamente 100 g de fezes, durante um  
 202 período de cinco dias, nos seguintes intervalos: 0, 6, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 72, 96, e 120

203 horas após a introdução da silagem marcada no rúmen, obtendo-se 11  
204 amostras/animal/período.

205 Para avaliar a taxa de passagem da fase líquida do conteúdo ruminal, no 19º dia  
206 de cada período, foi administrado no rúmen dos animais 30g de Co-EDTA diluídos em  
207 500 ml de água destilada, segundo Udén et al. (1980) antes da primeira alimentação.  
208 Foram coletados via cânula ruminal aproximadamente 50 mL de líquido ruminal, nos  
209 tempos 0 (que antecede a primeira alimentação) 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 24 horas após  
210 a alimentação da manhã. O pH foi medido imediatamente após a coleta do líquido  
211 ruminal nos tempos 0 2, 4, 6 e 8 horas, após a alimentação da manhã. Aproximadamente  
212 50 mL de líquido ruminal foram armazenados a -20 °C para análises de concentração de  
213 cobalto (Co), 25 mL acidificados com 0,5 mL de ácido sulfúrico 1:1 para determinação  
214 da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) e 25 ml para determinação dos  
215 ácidos graxos voláteis (AGV).

216 As amostras de conteúdo ruminal para a contagem de protozoários ciliados foram  
217 coletadas no 16º e 17º dia de cada período, antes do fornecimento da dieta. O conteúdo  
218 ruminal coletado para a contagem dos protozoários ciliados foi filtrado em gaze e  
219 espremido manualmente. Aproximadamente 10 ml do conteúdo ruminal foram  
220 armazenados com adição de igual volume de solução de formol (18,5% v/v).

221 No 17º e 18º dia de cada período, foi realizada uma coleta “spot” de urina,  
222 aproximadamente quatro horas após a alimentação, durante micção espontânea. As  
223 amostras foram filtradas em papel filtro para evitar possível contaminação. Uma  
224 alíquota de 15 mL de urina foi diluída com 5 mL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0,036 N a  
225 fim de evitar destruição bacteriana dos derivados de purina (DP) e precipitação do ácido  
226 úrico. As amostras de urina foram armazenadas em geladeira (5°C) e, posteriormente,  
227 submetidas às análises.

228 Os teores de MS, MO, PB e EE foram determinados segundo Silva & Queiroz  
229 (2002). A fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada segundo Van Soest et al.  
230 (1991), sem uso do sulfito de sódio e com inclusão de  $\alpha$ -amilase termo resistente. A  
231 fibra em detergente ácido (FDA) foi determinada de acordo com método no 973.18  
232 (AOAC, 1990). Para a quantificação dos carboidratos totais (CHOT), foi utilizada a  
233 equação:  $CHOT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Cinzas)$  e os teores de carboidratos não  
234 fibrosos (CNF) foram obtidos pela diferença entre os teores de CHOT e FDN (Sniffen  
235 et al. 1992).



236 Para determinar a quantidade de FDNi nas fezes e alimentos, as amostras foram  
237 acondicionadas em saquinhos ANKOM® previamente pesados, utilizando-se três  
238 repetições por amostra, sendo acondicionados nestes saquinhos seguindo uma relação  
239 de 20 mg de MS por centímetro quadrado de superfície (Nocek, 1988).

240 Os saquinhos foram incubados por 288 horas no rúmen de um bovino mestiço  
241 (Holandês x Zebu) alimentado com dieta, contendo, com base na MS, 70% de silagem  
242 de milho e 30% de concentrado (composto por milho moído, farelo de soja e mistura  
243 mineral), segundo Detmann et al. 2001. Após o período de incubação, os saquinhos  
244 foram retirados, lavados com água corrente até o total clareamento desta.

245 No equipamento ANKOM®, foram introduzidos os saquinhos juntamente com o  
246 saquinho controle (vazio), necessário para se efetuar a correção nos cálculos finais. A  
247 manipulação do equipamento ANKOM® foi realizada conforme recomendação do  
248 fabricante, mas caracteriza-se basicamente pela imersão dos materiais contidos nos  
249 saquinhos, em solução de FDN, em meio fechado sob aquecimento (100° C) e agitação,  
250 por aproximadamente 60 minutos. Após a retirada da solução, os saquinhos foram  
251 submetidos a três enxágues com água destilada quente durante cinco minutos cada,  
252 quando então foram retirados, escorridos e deixados imersos em acetona por três a cinco  
253 minutos. A secagem dos saquinhos foi realizada em estufa de ventilação forçada a 65°C  
254 durante 24 horas. Em seguida, os mesmos foram acondicionados em dessecador até  
255 atingirem a temperatura ambiente e pesados para a obtenção do resíduo de FDNi.

256 A concentração de cromo nas fezes foi determinada por espectrometria de  
257 absorção atômica, conforme técnica descrita por Willians et al. (1962). O ajuste  
258 matemático da curva de concentração de cromo nas fezes foi feito pelo modelo  
259 bicompartimental de Grovum & Williams (1973) e os cálculos dos parâmetros da  
260 dinâmica da fase sólida foram realizados de acordo as equações propostas por Colucci  
261 et al. (1990):  $TRR = 1/k_1$ ,  $TRPR = 1/k_2$ ,  $TMRT = TRR + TRPR + TT$ , em que: TRR  
262 (h) equivale ao tempo de retenção no rúmen-retículo; TRPR (h), tempo de retenção pós-  
263 rumen; K1 (%/h), a taxa de passagem de partículas no rúmen-retículo; K2 (%/h), taxa  
264 de passagem de partículas pós-rúmen; TMRT (h), tempo médio de retenção total e TT  
265 (h) corresponde ao tempo de trânsito.

266 A taxa de diluição foi determinada pela diminuição da concentração de Co  
267 ruminal em função do tempo. Para a determinação da concentração de cobalto, as  
268 amostras de líquido de rúmen, após o descongelamento, foram centrifugadas a 3.700

269 rpm por 30 minutos. As concentrações de cobalto nas amostras de líquido ruminal  
270 foram determinadas por espectrometria de absorção atômica Udén et al. (1980).

271 A taxa de passagem de fluidos e as curvas de concentração ruminal do Co foram  
272 ajustadas ao modelo exponencial unicompartimental de Hungate (1966):  $Y_{Co} = A \times e(-$   
273  $kl.t)$ , em que:  $Y_{Co}$  = concentração do indicador, no tempo  $t$ ;  $A$  = concentração de  
274 equilíbrio do Co;  $Kl$  = taxa de passagem ou de diluição do Co;  $t$  = tempo de  
275 amostragem;

276 Os parâmetros da dinâmica da fase líquida foram calculados de acordo com  
277 Colucci et al. (1990): Tempo de retenção no rúmen (h) ( $TeR$ ) =  $1 /$  taxa de passagem de  
278 fluidos (%/h) ( $klCo$ ) ; Volume de líquido ruminal (L) ( $VLR$ ) = quantidade de Co  
279 fornecida (mg) / $A$ ; Taxa de fluxo ruminal (L/h) ( $TxF$ ) =  $klCo \times VLR$ ; Taxa de  
280 reciclagem ( $TRec$ ) da fase líquida ruminal (nº de vezes/dia) =  $24 h/TeR$  calculada  
281 conforme (Maeng & Baldwin, 1976).

282 A dosagem de amônia nas amostras de líquido ruminal foi feita pela técnica de  
283 Vieira (1980). Para determinação dos AGV no líquido ruminal, as amostras foram  
284 descongeladas, colocadas em mini-tubos (Eppendorff) e centrifugadas a 3.500 rpm, por  
285 10 minutos, para posteriores análises. A análises de AGV foram realizada de acordo  
286 com a técnica descrita por Palmquist & Conrad (1971), utilizando um cromatógrafo  
287 gasoso (Finnigan 9001), com coluna de vidro empacotada (4% CW 20M – 80/120  
288 Carbopack B-DA) de 2,0m x 1/8'', acoplado a um integrador e um microcomputador.

289 A contagem diferencial da população de protozoários ciliados no rumne foi  
290 realizada no laboratório de metabolismo ruminal do Departamento de Zootecnia da  
291 Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentação da Universidade de São Paulo,  
292 campus de Pirassununga segundo a técnica descrita por Dehority (1993).

293 Para obter as concentrações dos derivados de purina, presentes na urina, foram  
294 realizadas as análises de alantoína segundo metodologia descrita por Chen & Gomes  
295 (1992) e a creatinina e ácido úrico, foram determinados usando kits comerciais  
296 Analisa<sup>®</sup>, e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1601).

297 A partir da concentração de creatinina, foi estimado o volume urinário (expresso  
298 em L/dia), dividindo-se a excreção diária de creatinina,  $mmol/kg PV^{0,75}$ , pela  
299 concentração de creatinina (mmol/L). Para determinação da excreção diária de  
300 creatinina ( $mmol/kg PV^{0,75}$ ), foi adotado o valor médio de 0,44  $mmol/kg PV^{0,75}$ , obtido  
301 por Chen et al. (1996) para bubalinos. A produção de nitrogênio (N) microbiano foi  
302 calculada a partir da quantidade de purinas absorvidas ( $X$ , mmol/dia), a qual foi

303 estimada a partir da excreção urinária de derivados de purina (DP) (Y, mmol/dia), por  
 304 meio da equação descrita por Dipu et al (2006) para bubalinos:  $Y = 0,74X + (0,117$   
 305  $PV^{0,75})$ ; em que o valor de 0,74 representa a recuperação de purinas absorvidas como  
 306 DP na urina e o valor da constante 0,117 mmol/kg de  $PV^{0,75}$ /dia representa a  
 307 contribuição endógena líquida de DP em bubalinos. A síntese de compostos  
 308 nitrogenados microbianos no rúmen (Y, g N/dia) foi calculada em função das purinas  
 309 absorvidas (X, mmol/dia), por meio da equação descrita por Chen & Gomes, (1992):

$$310 \quad Y = X \text{ (mmol / dia)} \times 70 / 0,116 \times 0,83 \times 1000$$

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

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

318 As análises estatísticas das variáveis estudadas foram interpretadas usando PROC  
 319 MIXED do SAS (*Statistical Analysis System, versão 9.2.*). Utilizou-se o delineamento  
 320 experimental, em quadrado latino 4x4, com quatro animais, quatro períodos e quatro  
 321 dietas, de acordo com o modelo:

$$322 \quad Y_{ijk} = \mu + A_i + P_j + T_k + e_{ijk}$$

323 em que:  $Y_{ijk}$  = variáveis observadas,  $\mu$  = média geral,  $A_i$  = efeito do animal  $i$ ,  
 324 variando de 1 a 4;  $P_j$  = efeito do período  $j$ , variando de 1 a 4;  $T_k$  = efeito do tratamento  $k$ ,  
 325 variando de 1 a 4;  $e_{ijk}$  = erro aleatório. Todos os efeitos foram considerados fixos, exceto  
 326 o efeito animal que foi considerado aleatório. Contrastes ortogonais polinomiais foram  
 327 usados para avaliar as respostas (Linear e quadrática) ao aumento do nível de  
 328 flavonóides na dieta.

329 Para as variáveis pH, N-NH<sub>3</sub> e AGV, procederam-se à subdivisão das parcelas  
 330 experimentais em função dos tempos de amostragem. Foi utilizada a análise de  
 331 regressão para as concentrações de pH, N-NH<sub>3</sub> e AGV do líquido ruminal, em função  
 332 do tempo após a alimentação da manhã. As diferenças entre as médias das dietas foram  
 333 determinadas pelo teste de Tukey, considerando 5% o grau de significância.

334

### 335 **Resultados e Discussão**

336

337 O consumo de matéria seca (CMS) e dos demais nutrientes não foram  
 338 influenciados ( $P>0,05$ ) com aumento das doses de compostos fenólicos totais nas dietas  
 339 (Tabela 3). Em estudos realizados anteriormente com o produto à base de própolis  
 340 LLOS C1 adicionados em dietas de bubalinos, também não foram encontradas  
 341 diferenças entre os tratamentos para consumo, (Costa Jr et al.,2012; Prado et al., 2010b).  
 342

343 Tabela 3 - Ingestão de matéria de seca e demais nutrientes das dietas

Item	Dietas				EPM <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>
	CON <sup>3</sup>	CF16 <sup>4</sup>	CF33 <sup>5</sup>	CF50 <sup>6</sup>		PBP
CMS, kg/d	7,79	7,85	7,93	8,10	0,14	0,50
g/kg de PC	14,2	14,3	14,4	14,8	0,04	0,46
g/PV <sup>0,75</sup>	68,6	69,1	69,5	71,0	1,87	0,36
CMO, kg/d	7,36	7,41	7,48	7,64	0,13	0,52
CPB, kg/d	0,81	0,82	0,81	0,85	0,01	0,33
CFDN, kg/d	3,66	3,71	3,78	3,82	0,07	0,42
CFDA, kg/d	2,22	2,75	2,30	2,32	0,05	0,64
CEE, kg/d	0,21	0,21	0,21	0,22	0,00	0,39
CCT, kg/d	6,43	6,48	6,56	6,69	0,12	0,50
CCNF, kg/d	2,77	2,77	2,78	2,86	0,05	0,57
CNDT, kg/d	5,62	5,70	5,73	5,77	0,10	0,77

344 <sup>1</sup>Efeito geral do produto à base de própolis (PBP) para as doses de compostos fenólicos avaliados; <sup>2</sup>Erro  
 345 Padrão da Média; <sup>3</sup>CON: dieta sem adição de composto fenólicos; <sup>4</sup>CF16: dieta com adição de 16,95  
 346 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>5</sup>CF33: dieta com adição de 33,9 mg/dia de compostos fenólicos  
 347 totais; <sup>6</sup>CF50: dieta com adição de 50,85 mg/dia de compostos fenólicos totais; CMS: Consumo de  
 348 Matéria Seca; CMO: Consumo de Matéria Orgânica; CFDN: Consumo de Fibra em Detergente Neutro;  
 349 CPB: Consumo de Proteína Bruta; CEE: Consumo de Extrato Etéreo; CFDA: Consumo de Fibra em  
 350 Detergente Ácido; CCT: Consumo de Carboidratos Totais; CCNF: Consumo de Carboidratos Não  
 351 Fibrosos; CNDT: Consumo de Nutrientes Totais Digestíveis.  
 352

353 O valor médio de CMS do presente estudo foi de 14 g/kg de PC. Este valor se  
 354 assemelha aos observados por Costa Jr et al. (2012) de 15 g/ kg de PC, para bubalinos  
 355 recebendo dietas com 70% de feno de *Cynodon ssp* e Maeda et al. (2007) de 14 g/kg de  
 356 PC, fornecendo dieta com três diferentes razões volumoso:concentrado 77:23%, 57:43%  
 357 e 37:63%. Gandra et al. (2011) observaram menor CMS para bubalinos, de 12 g/kg de  
 358 PC ao avaliar a digestibilidade de dieta à base de silagem de milho fornecida a três  
 359 grupo genéticos. Contrariando esses resultados, Prado et al. (2010b) também fornecendo  
 360 dietas à base de forragem a búfalos, encontraram maiores valores para o CMS (19 g/ kg  
 361 de PC). As exigências de manutenção de búfalas secas com 550 kg de PV segundo Kearnl  
 362 (1982) é de 16 g MS/ kg PC, de 589,6 g PB/dia e de 3.872 g NDT/dia. No presente  
 363 estudo a dieta foi balanceada para conter 9% de PB e 66% de NDT (Tabela 1), portanto,  
 364 ficou acima das exigências de manutenção dos animais, que ingeriram em média 820 g

365 PB/dia e 5.705 g NDT/dia, o que proporcionou um ganho médio diário de 928 g/dia aos  
366 animais.

367 A digestibilidade total da MS e dos demais nutrientes não foi influenciada com  
368 aumento das doses de composto fenólicos provenientes do produto à base de própolis  
369 (Tabela 4). Estes resultados contrariam os encontrados por Prado et al. (2010b) e Costa  
370 Junior et al. (2012), onde em ambos trabalhos foram observados maiores valores de  
371 digestibilidade total da MS, MO, FDN, FDA, CT os NDT para o produto LLOS C1 em  
372 relação à dieta controle quando fornecidos a búfalos. Vale destacar que nesses dois  
373 estudos, foi utilizado o mesmo produto à base de própolis (LLOS C1) usado neste  
374 trabalho, porém, com métodos de secagem diferentes (liofilização vs spray dryer). As  
375 alterações na concentração de ácidos fenólicos, flavonóides e conseqüentemente, na  
376 quantidade total composto fenólicos entre eles (Tabela 2) pode ser em parte responsável  
377 pelos resultados observados.

378

379 Tabela 4 - Digestibilidade total da matéria seca e demais nutrientes das dietas e teores  
380 de NDT

Item	Dietas				EPM <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>
	CON <sup>3</sup>	CF16 <sup>4</sup>	CF33 <sup>5</sup>	CF50 <sup>6</sup>		PBP
MS kg	0,707	0,713	0,709	0,698	0,89	0,42
MO kg/kg	0,718	0,723	0,720	0,701	0,80	0,47
PB kg/kg	0,692	0,655	0,660	0,658	1,08	0,14
FDN kg/kg	0,588	0,598	0,599	0,580	1,12	0,45
FDA kg/kg	0,581	0,593	0,608	0,582	0,96	0,16
EE kg/kg	0,865	0,858	0,845	0,847	1,36	0,60
CCT kg/kg	0,722	0,727	0,725	0,714	0,77	0,46
CNF kg/kg	0,896	0,899	0,895	0,892	0,64	0,70
NDT	0,708	0,728	0,728	0,708	1,32	0,43

381 <sup>1</sup>Efeito geral do produto à base de própolis (PBP) para as doses de compostos fenólicos avaliados; <sup>2</sup>Erro  
382 Padrão da Média; <sup>3</sup>CON: dieta sem adição de composto fenólicos; <sup>4</sup>CF16: dieta com adição de 16,95  
383 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>5</sup>CF33: dieta com adição de 33,9 mg/dia de compostos fenólicos  
384 totais; <sup>6</sup>CF50: dieta com adição de 50,85 mg/dia de compostos fenólicos totais; MS = Matéria Seca; MO  
385 = Matéria Orgânica; PB = Proteína Bruta; FDN = Fibra em Detergente Neutro; EE = Extrato Etéreo; FDA  
386 = Fibra em Detergente Ácido; CHOT = Carboidratos Totais; CNF = Carboidratos Não Fibrosos; NDT =  
387 Nutrientes Totais Digestíveis.

388

389 Segundo Bankova (2005), diferenças na composição química da própolis podem  
390 interferir na sua atividade biológica. O produto seco por liofilização apresentou menor  
391 concentração de ácidos fenólicos e maior de flavonóides em relação ao seco por spray  
392 dryer. Segundo Isla et al. (2005), ao avaliaram diferentes própolis de vários locais da  
393 Argentina e do Brasil, verificaram que todas as amostras mostraram a ação  
394 antimicrobiana, com destaque para aquelas que continham maior concentração de

395 flavonóide a pinocembrina. O extrato de própolis seco por liofilização apresentou maior  
 396 concentração de pinocembrina que no PBP seco por spray dryer utilizado no presente  
 397 trabalho. Essas variações na concentração de flavonóides pode explicar a diferença nos  
 398 resultados encontrados.

399 Não houve diferenças entre as dietas ( $P>0,05$ ), para a dinâmica da fase líquida e  
 400 sólida no trato gastrointestinal (Tabela 5). Inúmeros fatores podem influenciar a taxa de  
 401 passagem de sólidos no trato gastro-intestinal, como, proporção volumoso:concentrado,  
 402 composição da dieta, processamento dos alimentos, consumo de MS e idade dos  
 403 animais segundo Paul & Lal, (2010). Entretanto, no presente estudo, todos os animais  
 404 apresentavam pesos semelhante, mesma idade, e as dietas diferiram apenas na presença  
 405 ou não do aditivo, como os aditivos não influenciaram a variáveis de consumo, também  
 406 não ifluenciaram a dinâmica da fase líquida e sólida no trato gastrointestinal.

407

408 Tabela 5 - Dinâmica da fase líquida e sólida no trato gastrointestinal, de bubalinas  
 409 alimentas com dieta à base de forragem, com adição de níves de  
 410 flavonóides

Item	Dietas				EPM <sup>2</sup>	P <sup>1</sup> PBP
	CON <sup>3</sup>	CF16 <sup>4</sup>	CF33 <sup>5</sup>	CF50 <sup>6</sup>		
	Dinâmica da fase sólida					
k1, h <sup>-1</sup>	0,033	0,036	0,036	0,037	0,39	0,61
k2, h <sup>-1</sup>	0,179	0,178	0,169	0,170	0,79	0,69
TRRR, horas	31,2	28,5	29,1	28,0	3,55	0,58
TPR, horas	5,7	5,6	6,0	6,0	0,25	0,63
TMR, horas	36,9	34,1	35,0	34,1	3,64	0,65
TT, horas	18,5	16,9	19,5	19,9	2,39	0,81
TRT, horas	55,4	50,9	54,6	53,9	3,60	0,79
	Dinâmica da fase líquida					
Taxa passagem, h <sup>-1</sup>	0,115	0,115	0,103	0,102	1,22	0,14
Volume Ruminal, (L)	103,78	99,78	110,02	96,38	7,76	0,50
Tempo de Riclagem, (horas)	9,14	9,27	10,09	10,12	1,14	0,46
Taxa de Fluxo, (L/hora)	11,63	11,28	11,16	9,65	0,98	0,20
Taxa de Reciclagem, (vezes/dia)	2,77	2,76	2,47	2,45	0,29	0,14

411 <sup>1</sup>Efeito geral do produto à base de própolis (PBP) para as doses de compostos fenólicos avaliados; <sup>2</sup>Erro  
 412 Padrão da Média; <sup>3</sup>CON: dieta sem adição de composto fenólicos; <sup>4</sup>CF16: dieta com adição de 16,95  
 413 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>5</sup>CF33: dieta com adição de 33,9 mg/dia de compostos fenólicos  
 414 totais; <sup>6</sup>CF50: dieta com adição de 50,85 mg/dia de compostos fenólicos torais; k1=taxa de passagem no  
 415 rúmen-retículo; k2= taxa de passagem no pós-rumen; TRRR= Tempo de retenção rumen-retículo; TPR=  
 416 Tempo de retenção no pós-rumen; TMR= Tempo de retenção médio; TT= Tempo de transito; TRT=  
 417 tempo de retenção total

418

419 Os valores médio para a taxa de passagem de sólido no rúmen-reticulo (k1) foi de,  
 420 0,035 h<sup>-1</sup>, este valor é superior ao encontrado por Terramoccia et al. (2000), que  
 421 forneceram quatro dietas com diferentes níveis de concentrado, sendo a dietas com 87%

422 de forragem o valor observado foi de 0,028 h<sup>-1</sup> para o k1. Para a taxa de passagem de  
 423 líquido, o valor médio observado no presente estudo (0,108 h<sup>-1</sup>), foi próximo do valor  
 424 relatado por Prado et al. (2010b) de 0,115 h<sup>-1</sup>.

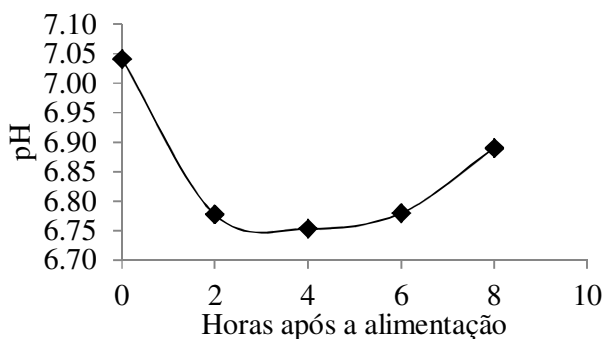
425 O pH ruminal (Tabela 6) apresentou comportamento linear crescente (P<0,05)  
 426 com aumento das doses de compostos fenólicos, com diferença entre os tratamentos  
 427 (P=0,08). Houve efeito do pH (P>0,05) para tempo de coleta (Figura 1). Foi observado  
 428 um comportamento quadrático do pH em função do tempo, o menor valor obtido do pH  
 429 no líquido ruminal foi de 6,72 e ocorreu 4,6 horas após a alimentação. Segundo Van  
 430 Soest, (1994), a taxa de digestão pode ser inibida para valores de pH inferiores a 6,2,  
 431 portanto, o pH não interferiu nos parâmetros de digestão do presente estudo.

432

433 Tabela 6 – Valores médios dos ácidos graxos volatéis, pH, nitrogênio amoniacal, razão  
 434 acetato:propionato em dieta com produtos à base de própolis.

Item	Diets					P <sup>1</sup>		
	CON <sup>3</sup>	CF16 <sup>4</sup>	CF33 <sup>5</sup>	CF50 <sup>6</sup>	EPM <sup>2</sup>	PBP	L	Q
AGV total, mmol/mL	74,6	76,0	76,7	69,6	3,81	0,14	0,19	0,07
Acetato, mmol/mL	51,5	53,4	53,3	48,1	2,59	0,10	0,18	0,04
Propionato, mmol/mL	13,7	14,1	14,3	12,7	0,71	0,27	0,31	0,12
Butirato, mmol/mL	9,30	8,51	9,10	8,81	0,74	0,40	0,71	0,46
Ace:Prop mmol/mL	3,86	3,82	3,79	3,86	0,08	0,90	0,91	0,51
pH	6,78	6,76	6,88	6,96	0,06	0,08	0,02	0,36
N-NH <sub>3</sub> , mg/100mL	9,58	8,81	9,63	9,70	1,18	0,56	0,51	0,41

435 <sup>1</sup>Efeito geral do produto à base de própolis (PBP) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses de  
 436 compostos fenólicos avaliados; <sup>2</sup>Erro Padrão da Média; <sup>3</sup>CON: dieta sem adição de composto fenólicos;  
 437 <sup>4</sup>CF16: dieta com adição de 16,95 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>5</sup>CF33: dieta com adição de 33,9  
 438 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>6</sup>CF50: dieta com adição de 50,85 mg/dia de compostos fenólicos  
 439 totais;



440

$$\text{pH} = 7,02 - 0,129T + 0,014T^2 \quad (R^2 = 0,94)$$

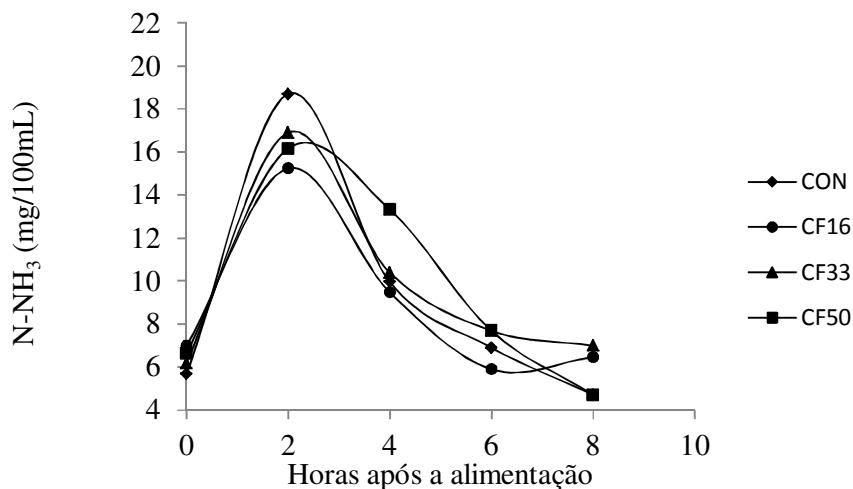
441

442

443 Figura 1. pH do líquido ruminal em função de horas após a alimentação.

444

445 Houve interação ( $P < 0,05$ ) dieta x horário de coleta para a concentração de  
 446 nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) no líquido ruminal (Figura 2). As concentrações de  $N-$   
 447  $NH_3$  no líquido ruminal para as dietas CF16 (15,24 mg/100mL) e CF50 (16,16  
 448 mg/100mL), foram inferiores às dietas CON (18,69 mg/100mL), no pico de  
 449 concentração de  $N-NH_3$ , que ocorreu 2 horas após a alimentação.



450

451 Figura 2. Concentração de nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) mg/100 mL no líquido  
 452 ruminal em relação do tempo após a alimentação, em função das dietas.

453

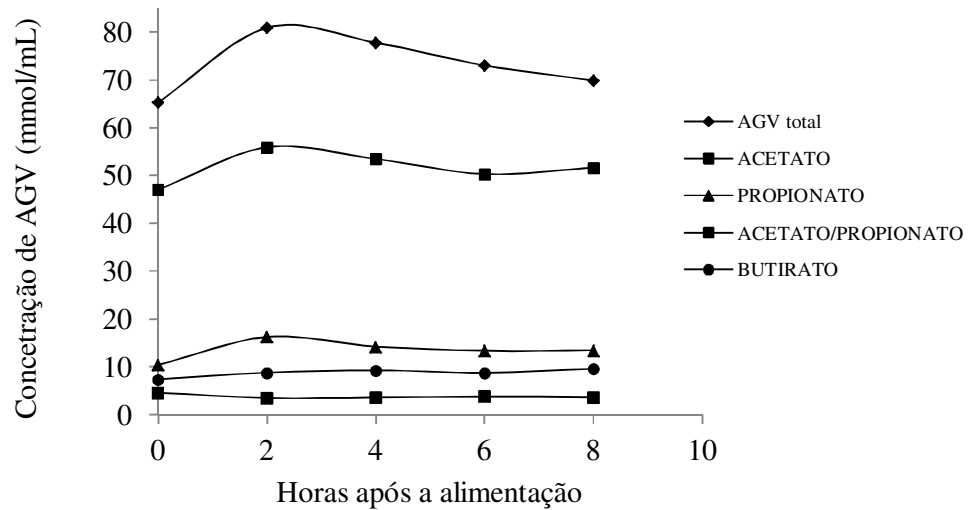
454 Em trabalhos de pesquisas com ruminantes e extrato de própolis fornecido na  
 455 dieta também foram observadas reduções na concentração de  $N-NH_3$  ruminal (Aguiar,  
 456 2012; Stradiotti Jr et al. 2004; Oeztuerk et al. 2010; Ozturk et al. 2010). Aguiar et al.  
 457 (2013) avaliou a atividade antimicrobiana de extrato de própolis com diferentes  
 458 concentrações de compostos fenólicos contra as bactérias ruminais, e observou que as  
 459 bactérias super produtoras de amônia (*Peptostreptococcus* sp e *Clostridium*  
 460 *aminophilum*), foram inibidas por todos os extratos testados. Isso indica que o extrato de  
 461 própolis pode exercer um papel na diminuição da degradação da proteína do rúmen e,  
 462 consequentemente, melhorar a utilização de nitrogênio da dietas para ruminantes em  
 463 níveis elevados de produção.

464 Não houve interação de dieta x horário de coleta ( $P > 0,05$ ), efeito de dietas, porém  
 465 houve efeito de horário de coleta para a concentração de ácidos graxos voláteis (AGV)  
 466 Figura 3.

467 Os valores máximos estimados de AGV no líquido ruminal foram: 75,9 mmol/mL  
 468 de AGV total às 1,94 h; 53,9 mmol/mL de acetato às 4,3 h; 15 mmol/mL de propionato  
 469 às 5,14 h; 3,46:1 a razão acetato/propionato às 4,5 h; 9,38 mmol/mL de butirato às 7,02  
 470 h (Figura 4). Estes resultados são semelhantes aos observados por Prado et al. (2010b)



471 quando avaliaram dieta com 80% de volumoso fornecida a bubalinos e observaram  
 472 valores de 73,51 mmol/mL, 52,58 mmol/mL, 12,98 mmol/mL e 7,94 mmol/mL para  
 473 AGV total, acetato, propionato e butirato, respectivamente.  
 474



475

476 AGVt:  $67,53+5,65T-0,69T^2$  ( $R^2=0,71$ ); Acetato:  $48,73+2,41T-0,28T^2$  ( $R^2=0,43$ );  
 477 Propionato:  $11,41+1,62T-0,18T^2$  ( $R^2=0,48$ ); Acetato/Propionato:  $4,39-0,36T+0,035T^2$   
 478 ( $R^2=0,70$ ); Butirato:  $7,56+0,52T-0,037T^2$  ( $R^2=0,77$ );

479

480 Figura 3. Concentração de ácidos graxos voláteis (mmol/mL) e proporção  
 481 acetato/propionato no líquido ruminal em função de horas após a  
 482 alimentação.  
 483

484 Foi observado efeito quadrático entre as dietas ( $P<0,05$ ) para a concentração de  
 485 acetato (Tabela 6). As dietas CF16 e CF33, apresentaram maior concentração de  
 486 acetato, em relação à dieta CON e CF50. Houve também efeito ( $P=0,07$ ) quadrático  
 487 para maior concentração de AGV totais para as dietas CF16 e CF33 em relação as  
 488 outras duas dietas. Esses resultado estão de acordo aos observados por Costa Jr et al.  
 489 (2012), que também observaram maior concentração de acetato ( $P=0,084$ ) e maior  
 490 produção de AGV totais ( $P<0,05$ ), para as dietas com adição do produto à base de  
 491 própolis LLOS C1, em relação a dieta CON. Pode-se inferir que os produtos à base de  
 492 própolis de alguma maneira altera a fermentação ruminal, aumentando a produção de  
 493 acetato em dietas à base de forragem.

494 As concentrações e composições médias da população de protozoários ciliados no  
 495 rúmen de bubalinas encontram-se na (Tabela 7). Foi observada a ocorrência de ciliados  
 496 no rúmen de bubalinas dos gêneros *Entodinium*, *Epidinium* e *Isotricha*, e da subfamília  
 497 Diplodiniinae. Não foram observados protozoários ciliados dos gêneros *Dasytricha* e  
 498 *Charonina*.

499 Tabela 7 - Contagem de protozoários ciliados no rumen de dieta com produto à base de  
 500 própolis

Item	Dietas				EPM <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>		
	CON <sup>3</sup>	CF16 <sup>4</sup>	CF33 <sup>5</sup>	CF50 <sup>6</sup>		PBP	L	Q
	Nx10 <sup>5</sup> ciliates/mL							
<i>Entodinium</i>	1,59	1,41	1,36	1,16	0,14	0,07	0,01	0,93
Diplodiniinae	4,13	2,83	2,81	3,28	0,34	0,34	0,34	0,14
<i>Epidinium</i>	0,08	0,16	0,12	0,08	0,03	0,21	0,55	0,07
<i>Isotricha</i>	0,04	0,05	0,02	0,05	0,02	0,72	0,84	0,84
Total	5,85	4,47	4,32	4,57	0,70	0,29	0,18	0,20
Ento:Diplo	0,45	0,53	0,49	0,39	0,07	0,56	0,49	0,24
	% do total							
<i>Entodinium</i>	29,6	32,5	32,1	26,9	3,52	0,61	0,58	0,25
Diplodiniinae	68,7	63,6	65,0	71,0	3,84	0,43	0,59	0,14
<i>Epidinium</i>	1,55	3,80	2,85	2,00	0,81	0,21	0,98	0,07
<i>Isotricha</i>	0,57	1,12	0,51	1,10	0,36	0,52	0,71	0,96

501 <sup>1</sup>Efeito geral do produto à base de própolis (PBP) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses de  
 502 compostos fenólicos avaliados; <sup>2</sup>Erro Padrão da Média; <sup>3</sup>CON: dieta sem adição de composto fenólicos;  
 503 <sup>4</sup>CF16: dieta com adição de 16,95 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>5</sup>CF33: dieta com adição de 33,9  
 504 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>6</sup>CF50: dieta com adição de 50,85 mg/dia de compostos fenólicos  
 505 totais;  
 506

507 Foi observado um comportamento linear (P<0.05) sobre a população de  
 508 *Entodinium* (Tabela 7), quanto maior o nível de compostos fenólicos, maior foi o poder  
 509 de redução do aditivo sobre os protozoários. Jouany (1996) relata que os protozoários  
 510 do gênero *Entodinium* são degradadores da fração insolúvel da proteína, e no presente  
 511 estudo foi observado (P <0,05) diminuição da produção de N-NH<sub>3</sub> para as dietas CF16 e  
 512 CF50, em relação à dieta CON, o que pode ser em parte explicado pela redução dos  
 513 *Entodinium*.

514 Estes resultados estão em acordo com aqueles observados por Rispoli et al.  
 515 (2009), que ao adicionarem o produto a à base de propolis LLOS C1 em dietas com  
 516 50% de volomoso fornecida para bubalinos, também observou uma redução na  
 517 população de ciliados do gênero *Entodinium* em relação à dieta sem adição de aditivo.  
 518 Yaghoubi et al. (2010), avaliaram doses crescentes de flavonoides totais (0, 17, 35, 70 e  
 519 140 µg/mL do fluido de cultura) provenientes de extrato de própolis e incubaram em  
 520 meios de cultura, com diferentes proporções volumoso:concentrado (100, 50 e 20% de

521 volumoso). As doses de flavonóides, independentemente da proporção  
522 volumoso:concentrado, reduziram linearmente o número total de protozoários.

523 A população de Diplodiniinae foi a mais representativa em todos os tratamentos,  
524 com o mínimo de 63% para a dieta CF16 e no máximo 71% para a dieta CF50. Esses  
525 resultados estão de acordo com Franzolin & Dehority, (1999) que também encontraram  
526 maior população de Diplodiniinae em bubalinos alimentados com dietas à base de  
527 capim. A maior população de Diplodiniinae, pode ser explicada pela grande quantidade  
528 de forragem da dieta, uma vez que os Diplodiniinae são considerados principalmente  
529 microrganismos celulolíticos (Bohatier, 1991). A população de protozoários da  
530 subfamília Diplodiniinae sofreu uma redução numérica de 31,5% para as dietas CF16 e  
531 CF33 e de 20,6% com o nível de CF50 em relação à dieta CON, porém sem efeito  
532 significativo ( $P > 0.05$ ).

533 Segundo Jouany et al. (1988), decréscimo na população de protozoários  
534 frequentemente é relacionado com uma menor digestibilidade da FDN, o que não foi  
535 observado no presente estudo.

536 Não houve diferenças entre as dietas ( $P > 0,05$ ) para a síntese de proteína  
537 microbiana e eficiência de síntese de proteína microbiana (Tabela 8). Apesar de não ter  
538 ocorrido diferenças significativas entre as dietas, houve aumento na eficiência de síntese  
539 microbiana de 23% para a dieta CF16 e de 33% para a dieta CF50, em relação à dieta  
540 CON. O valor médio observado no presente estudo foi de 8,04 e 8,75 g PBmic/100g de  
541 NDT, para as dietas CF16 e CF50, respectivamente, e de 6,54 g PBmic/100g de NDT  
542 para a dieta controle.

543 Houve diferença ( $P < 0,05$ ) para a excreção de ácido úrico, a dieta CF50 apresentou  
544 uma maior excreção em relação a outras dietas, e as dietas CF16 e CF33, foram  
545 superiores a dieta CON.

546 A técnica de determinação da excreção urinária dos derivados de purina admite  
547 que os ácidos nucléicos no duodeno são de origem predominantemente microbiana e  
548 após digestão intestinal e absorção, tais derivados são proporcionalmente recuperados  
549 na urina, principalmente na forma de alantoína, mas também como hipoxantina, xantina  
550 e ácido urico (Chen & Gomes. 1992). Entretanto, búfalos apresentam alta atividade da  
551 enzima xantina oxidase na mucosa intestinal que converte praticamente toda  
552 hipoxantina e xantina em ácido urico (Chen et al. 1996). Possivelmente, os animais que  
553 receberam os compostos fenólicos oriundos da própolis na dieta apresentaram uma  
554 maior atividade da xantina oxidase comparado à dieta CON. Entretanto, não existe na

555 literatura trabalhos que mostrem a ação dos compostos fenólicos da própolis sobre esta  
556 enzima em ruminantes, sendo necessários mais estudos para comprovar tal relato.

557 A proporção de excreção da alantoína e ácido urico foram de 97% e 3%,  
558 respectivamente. Esta proporção está próxima dos valores observados por Costa Jr et al.  
559 (2012) de 99,1 de alantoína e 0,9% de ácido úrico, porém está acima dos valores  
560 observados por Pimpa et al (2007) que obtiveram 77,3% de alantoína e 22,7% de ácido  
561 úrico.

562

563 Tabela 8. Síntese de proteína microbiana e eficiência de síntese microbiana

Item	Dietas				EPM <sup>2</sup>	P <sup>1</sup>
	CON <sup>3</sup>	CF16 <sup>4</sup>	CF33 <sup>5</sup>	CF50 <sup>6</sup>		PBP
VU (L)	20,1	20,1	20,8	20,6	3,32	NS
Derivados de Purina (mmol/dia)						
ALA	72,5	84,8	73,7	99,8	10,1	0,24
AcU	1,71c	1,88b	1,82b	2,04a	0,24	0,00
PuAb	82,1	99,0	83,9	98,6	12,5	0,45
Nitrogênio Microbiano (g/dia)						
Nmic	59,7	71,9	61,0	71,6	9,13	0,45
Síntese de proteína microbiana (g/Day)						
SPBmic	373,0	449,8	381,7	447,9	57,0	0,45
Eficiência microbiana( g SPBmic/100g de NDT)						
EPBmic	6,54	8,04	6,34	8,75	1,21	0,46

564 <sup>1</sup>Efeito geral do produto à base de própolis (PBP) para as doses de compostos fenólicos avaliados; <sup>2</sup>Erro  
565 Padrão da Média; VU = volume urinário; ALA = alantoína (mmol/day); AcU = ácido urico (mmol/day);  
566 PuAB = purinas absorvidas; <sup>2</sup>Erro Padrão da Média; <sup>3</sup>CON: dieta sem adição de composto fenólicos;  
567 <sup>4</sup>CF16: dieta com adição de 16,95 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>5</sup>CF33: dieta com adição de 33,9  
568 mg/dia de compostos fenólicos totais; <sup>6</sup>CF50: dieta com adição de 50,85 mg/dia de compostos fenólicos  
569 totais;

570

571 **Conclusão**

572

573 O produto com compostos fenólicos oriundos da própolis promove redução na  
574 população de protozoários ciliados do gênero *Entodinium* no rúmen de búfalos, e  
575 redução na concentração N-NH<sub>3</sub> do líquido ruminal.

576 O produto à base de própolis LLOS C1 pode ser usado em dietas para búfalos  
577 visando melhorar a eficiência do metabolismo ruminal em determinadas condições de  
578 alimentação.

579 **Referências**

- 580 ADELMANN, J. **Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e**  
581 **bioatividade antimicrobiana / antioxidante.** 2005, 186p, Dissertação (Mestrado  
582 em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Paraná, Universidade Federal  
583 do Paraná Curitiba, PR, 2005.
- 584 AGUIAR, S. C.; ZEOULA, L. M.; FRANCO, S. L. et al. Antimicrobial activity of  
585 brazilian propolis extracts against rumen bacteria *in vitro*. **World Journal**  
586 **Microbiology and Biotechnology**, 2013. DOI 10.1007/s11274-013-1361-x (no  
587 prelo).
- 588 AGUIAR, S.C. **Quantificação e caracterização dos compostos ativos da própolis e**  
589 **seus efeitos sobre a nutrição e qualidade do leite de vacas e cepas bacterianas**  
590 **do rúmen.** 2012. 126f. Tese (Dourado em Zootecnia) – Universidade Estadual de  
591 Maringá, Maringá.
- 592 ALVES, T. C. **Desenvolvimento ponderal, características da carcaça e eficiência da**  
593 **nutrição energética e protéica no metabolismo ruminal de búfalos e produção**  
594 **de gase *in vitro*.** 2010. 146f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de  
595 Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Pirassunuga.
- 596 ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official**  
597 **methods of analysis.** 15.ed. Virginia, Washington: Arlington, 1990. 1298p.
- 598 BANKOVA, VASSYA. Recent trends and important developments in propolis  
599 research. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v.  
600 2, n. 1, p. 29-32, 2005.
- 601 BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica.  
602 **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 293-298, 2007.
- 603 BERNARDES, O. Bubalínocultura no Brasil e no Mundo, importância para o  
604 Agronegócio. In: I SIMPÓSIO DA CADEIA PRODUTIVA DA  
605 BUBALINOCULTURA, 9., 2012, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Faculdade de  
606 medicina veterinária e zootecnia.
- 607 BOHATIER, J. The rumen protozoa: taxonomy, cytology and feeding behaviour. In:  
608 JOUANY, J.P. (Ed.). **Rumen microbial metabolism and ruminant digestion.**  
609 Paris: Inra, 1991. p.27-38.
- 610 CHEN, X. B.; SAMARAWEERA, L.; KYLE, D. J. et al. Urinary excretion of purine  
611 derivatives and tissue xanthine special reference to differences between buffaloes  
612 and Bos taurus cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 397-407, 1996.
- 613 CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle  
614 based on urinary excretion of purine derivatives an overview of technical details.  
615 Bucksburnd: **Rowett Research Institute**, 1992. 21p (Occasional publication).
- 616 COLUCCI, P. E.; MACLEOD, G. K.; GROVUM, W. L. et al. Digesta kinetics in sheep  
617 and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low  
618 intakes. **Journal of dairy science**, v. 73, n. 8, p. 2143-56, 1990.
- 619 COSTA JR, J.B.G.; ZEOULA, L.M.; FRANCO, S. L. et al. Effect of propolis product  
620 on digestibility and ruminal parameters in buffaloes consuming a forage-based diet.  
621 **Italian Journal of Animal Science**, v. 11, n. 78, p. 441-448, 2012.
- 622 DEHORITY, B. A. **Laboratory manual for classification and morphology of rumen**  
623 **ciliate protozoa.** CRC Press, Boca Raton, FL. 1993.
- 624 DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C.; PAULINO, M.F. et al. Cromo e  
625 indicadores internos na determinação do consumo de novilhos mestiços,  
626 suplementados, a pasto. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1600-1609,  
627 2001.

- 628 DIPU, M. T.; GEORGE, S. K.; SINGH, P.; et al. Measurement of microbial protein  
629 supply in Murrah Buffaloes (*Bubalus bubalis*) using urinary purine derivatives  
630 excretion and PDC Index. **Asian-Australian Journal of Animal. Science**, Vol 19,  
631 No. 3,p.347-355, 2006.
- 632 FRANCO, S.L.; BUENO, J.H.F. Otimização de processo extrativo de própolis.  
633 **Infarma**, v.11, n.11/12, p.48-51, 1999.
- 634 FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B.A. Comparison of protozoal populations and  
635 digestion rates between watter buffalo and cattle fed an all forage diet. **Journal of**  
636 **Applied Animal Research**, v.16,p.33-46, 1999.
- 637 GANDRA, J. R.; FREITAS, J. E.; BARLETTA, R. V. et al. Productive performance,  
638 nutrient digestion and metabolism of Holstein (*Bos taurus*) and Nellore (*Bos taurus*  
639 indicus) cattle and Mediterranean Buffaloes (*Bubalis bubalis*) fed with corn-silage  
640 based diets. **Livestock Science**, v. 140, n. 1-3, p. 283-291, 2011. Elsevier B.V.
- 641 GROVUM, W. L.; WILLIAMS, V. J. Rate of passage of digesta in sheep. **British**  
642 **Journal of Nutrition**, v. 29, n. 01, p. 13, 1973.
- 643 HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes**. ed. Academic Press, New York, p.  
644 533, 1966.
- 645 ISLA, M. I.; GUZMAN, P. J. F.; MORENO, M. N. I. et al. Some Chemical composition  
646 and biological activity of northern Argentine propolis. **Journal of Agricultural and**  
647 **food chemistry**, v.53, p. 1162-1172, 2005.
- 648 JOUANY, J. P; DEMEYER, D. I; GRAIN, J. Effect of Defaunation the Rumen.  
649 **Animal Feed Science and Technology**. P.229-265, 1988.
- 650 JOUANY, J.P. Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. **Journal**  
651 **Animal Nutrition**. Bethesda, v.126 (suppl.), p. 1335-1346, 1996.
- 652 KEARL, L.C. **Nutrients requirements of ruminants in developing countries**. Lugan:  
653 International Feestuffs Institute, 1982. 271p.
- 654 MAEDA, E. M.; ZEOULA, L. M.; GERON, J.V. et al. Digestibilidade e características  
655 ruminais de dietas com diferentes níveis de concentrado para bubalinos e bovinos.  
656 **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 3, p. 716-726, 2007.
- 657 MAENG, W.J., BALDWIN, R.L. Dynamics of fermentation of purified diet and  
658 microbial growth in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.59, n.4, p.636-642.  
659 1976.
- 660 NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy  
661 digestibility. A review. **Journal Dairy Science**., v.71, p.2051-2069, 1988.
- 662 OEZTUERK, H.; EMRE, B.; SAGMANLIGIL, V. et al. Effects of Nisin and Propolis  
663 on Ruminal Fermentation *in vitro*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**,  
664 v. 21, n. 9, p. 2752-2758, 2010.
- 665 OLIVEIRA, J.S.; LANA, R.D.P.; BORGES, A.C. et al. Efeito da Monensina e Extrato  
666 de Própolis sobre a Produção de Amônia e Degradabilidade *In Vitro* da Proteína  
667 Bruta de Diferentes Fontes de Nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33,  
668 n. 2, p. 504-510, 2004.
- 669 OWENS, F. N.; GOETSCH, A. L. **Ruminal fermentation**. In: **Church, d.c.the**  
670 **ruminantanimal digestive physiologyand nutrition**.Englewood Cliffs: O. &  
671 Books Inc. 1988. p.146-171.
- 672 OZTURK, H.; PEKCAN, M.; SIRELI, M.; FIDANCI, U. R. Effects of propolis on *in*  
673 *vitro* rumen microbial fermentation. **Ankara Univ Vet Fark Derg**, v. 57, n. 5, p.  
674 217-221, 2010.
- 675 PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed  
676 high fat diets. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3152, 1971.

- 677 PAUL, S. S.; LAL, D. **Nutrients Requirements of Buffaloes**. 1st ed. Delhi: Satish  
678 Serial Publishing House, 2010.
- 679 PIMPA, O.; LIANG, J. B.; BALCELLS, J. Renal and salivary excretions of plasma  
680 purine derivatives in swamp buffaloes and zebu cattle. **Asian-Australia Journal of**  
681 **Animal Science**, vol.20, n.8. p. 1201-1207, 2007.
- 682 PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. et al. Efeito da adição de  
683 própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em  
684 bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. **Revista Brasileira de**  
685 **Zootecnia**, v. 39, n. 9, p. 2055-2065, 2010b.
- 686 PRADO, O. P. P.; ZEOULA, L. M.; MOURA, L. P. P. et al. Isolation and expeditious  
687 morphological , biochemical and kinetic characterization of propolis-tolerant  
688 ruminal bacteria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 9, p. 2048-2054, 2010a.
- 689 RÍSPOLI, T. B.; RODRIGUES, I. L.; MARTINS NETO, R. G. et al. Protozoários  
690 ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas  
691 com monensina ou própolis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 1, p. 92-  
692 97, 2009.
- 693 SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. Análises de alimentos. 3.ed. Viçosa, MG:  
694 UFV, Imprensa Universitária, 2002. 235p.
- 695 SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D., VAN SOEST, P. J. et al. A net carbohydrate and  
696 protein system for evaluating cattle diets II. Carbohydrate and protein availability.  
697 **Journal of Animal Science**, v. 70, n.11, p.3562-3577, 1992.
- 698 STRADIOTTI JR, D.; QUEIROZ, A. C.; LANA, R. D. P. et al. Ação da Própolis sobre  
699 a Desaminação de Aminoácidos e a Fermentação Ruminal. **Revista Brasileira de**  
700 **Zootecnia**, v. 33, n. 4, p. 1086-1092, 2004.
- 701 TERRAMOCCIA, S.; BARTOCCI, S.; AMICI, A. et al. **Protein and protein free dry**  
702 **matter rumen degradability in buffalo, cattle and sheep fed diets with different**  
703 **forage to concentrate ratios**. *Livestock Production Science*, v. 65, p.185-195,  
704 2000.
- 705 UDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and  
706 cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of**  
707 **Food and Agriculture**, v.31, n.7, p.625-632, 1980.
- 708 VAN SOEST, P.J. Nutritional ecology of the ruminant. 2.ed. Ithaca: Cornell University  
709 Press, p. 476, 1994.
- 710 VAN SOEST, P.J.; ROBERTSON, J.B.; LEWIS, B.A. Methods for dietary fiber,  
711 neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition.  
712 **Journal of Animal Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- 713 VIEIRA, P.F. Efeito do formaldeído na **proteção de proteínas e lipídeos em ração**  
714 **para ruminantes**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1980. 98p. Tese  
715 (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 1980.
- 716 WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J.; ILSMAA, O. The determination of chromic oxide in  
717 faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Agricultural**  
718 **Science**, v.59, n.1, p.381-385, 1962.
- 719 YAGHOUBI, S. M. J; GHORBANI, G. R; RAHMANI, H. R. et al. Flavonoids  
720 manipulation of rumen fermentation: An alternative for Monensin? **Agricultural**  
721 **Segment**. e-segments.com/?id=1508. 2010.