

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRÓPOLIS BRUTA E EXTRATO ETANÓLICO DE  
PRÓPOLIS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Cinthia Eying  
Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Alice Eiko Murakami

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Novembro – 2012

# PRÓPOLIS BRUTA E EXTRATO ETANÓLICO DE PRÓPOLIS NA ALIMENTAÇÃO DE FRANGOS DE CORTE

Autor: Cinthia Eyng  
Orientador: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Alice Eiko Murakami

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção Animal.

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Novembro – 2012

*Ao meu pai e minha mãe*

*pelo amor,  
incentivo a prosseguir,  
por acreditar que o estudo é o único caminho a ser seguido,  
por muitas vezes abdicar de seus sonhos pelos meus  
e pelos ensinamentos que formaram os alicerces da minha vida*

*Ao Fábio Bittencourt*

*pelo apoio incondicional em todos os momentos,  
amor e dedicação,  
sem você ao meu lado nenhuma conquista valeria a pena*

*Ao meu irmão Eduardo Eyng e minha cunhada Daline Backes*

*pela amizade e colaboração*

**DEDICO**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Estadual de Maringá, por ter possibilitado desenvolver este trabalho.

À minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Alice Eiko Murakami, por sua orientação, amizade, confiança, por todas as inúmeras oportunidades, pelas cobranças que foram responsáveis pelo meu amadurecimento pessoal e profissional e principalmente por acreditar que eu sou capaz, meu reconhecimento e agradecimento.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pelo conhecimento repassado.

As professoras Tatiana Carlesso dos Santos e Thais Gomes Verzignassi Silveira e a pós-doutoranda Raíssa Bocchi Pedroso, pela valiosa colaboração nas inúmeras análises.

À Adriana Ayres Pedroso, pela amizade e conhecimento repassado durante meu período de doutorado sanduíche, meu agradecimento.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação, Rose Pepinelli e Denilson dos Santos Vicentin, por toda a ajuda durante meu período no programa.

A todos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial “Seu Toninho”, pela amizade e dedicação durante a realização destes e de inúmeros outros trabalhos.

Aos colegas Ana Flávia, Ana Paula, Alexandra, Andressa, Bianca, Caio, Camila, Celma, Cristiano, Fábio, Fernando, Guilherme, Jamile, Karol, Leandro, Luciana, Maíra, Mariana, Rafael, Juliana, pela amizade e imensa colaboração na condução dos experimentos.

À minha amiga Karla Marielli e sua família, pelo companheirismo e por ter me acolhido muitas vezes em sua casa, meu carinho e gratidão.

Aos meus amigos Cristiane, Karla Picolli, Mayra e Camilo, pelo exemplo em dedicação, companheirismo, ajuda e por estarem presentes em todos os momentos desta jornada, fazendo das incansáveis horas de fazenda e laboratórios momentos inesquecíveis, meu eterno agradecimento.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos e financiamento do projeto de pesquisa.

A todos que de alguma forma ajudaram na concretização deste sonho. Meu sincero agradecimento.

## **BIOGRAFIA**

CINTHIA EYNG, filha de Terezinha Camargo Eyng e José Ademir Eyng, nasceu em Toledo, Paraná, no dia 06 de dezembro de 1984.

Em novembro de 2006, concluiu o curso de Zootecnia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Em março de 2007, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível de Mestrado, área de concentração Produção e Nutrição Animal, na Universidade Estadual do Oeste do Paraná e no dia 12 de março de 2009, submeteu-se a banca para defesa da Dissertação.

Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal na Universidade Estadual de Maringá.

No dia 27 de novembro de 2012, submeteu-se a banca para defesa da Tese.

## ÍNDICE

	Página
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xivv
<b>I – INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
1.1.1 Uso de aditivos sintéticos e naturais em rações de frangos de corte .....	2
1.1.2 Própolis – aspectos gerais .....	5
1.1.3 Efeito modulador de desempenho .....	7
1.1.4 Efeito sobre as enzimas digestivas .....	11
1.1.5 Efeito sobre o perfil bioquímico .....	12
1.1.6 Efeito imunoestimulante .....	13
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	16
<b>II – OBJETIVOS GERAIS</b> .....	25
<b>2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	25
<b>III – Efeito da suplementação de extrato etanólico de própolis na dieta sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte</b> .....	26
<b>Resumo</b> .....	26
<b>Abstract</b> .....	27
<b>Introdução</b> .....	28
<b>Material e Métodos</b> .....	29
<b>Resultados e Discussões</b> .....	33
<b>Conclusão</b> .....	44
<b>Referências</b> .....	45
<b>IV – Efeito da suplementação de própolis bruta sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte</b> .....	49
<b>Resumo</b> .....	49
<b>Abstract</b> .....	50
<b>Introdução</b> .....	51
<b>Material e Métodos</b> .....	52

Resultados e Discussões .....	55
Conclusão.....	65
Referências .....	66
<b>V – Extrato etanólico de própolis como agente imunoestimulante na alimentação de frangos de corte na fase inicial.....</b>	<b>69</b>
Resumo.....	69
Abstract.....	70
Introdução .....	71
Material e Métodos .....	72
Resultados e Discussões .....	75
Conclusão.....	82
Referências .....	83
<b>VI – Própolis bruta como agente imunoestimulante na alimentação de frangos de corte na fase inicial .....</b>	<b>87</b>
Resumo.....	87
Abstract.....	88
Introdução .....	89
Material e Métodos .....	90
Resultados e Discussões .....	93
Conclusão.....	100
Referências .....	101
<b>VII - Microbiota cecal de frangos de corte alimentados com extrato etanólico de própolis mensurada por hibridização fluorescente <i>in situ</i> .....</b>	<b>104</b>
Resumo.....	104
Abstract.....	105
Introdução .....	106
Material e Métodos .....	107
Resultados e Discussão .....	110
Conclusão.....	113
Referências .....	114
<b>VIII - Microbiota cecal de frangos de corte alimentados com rações contendo própolis bruta mensurada por hibridização fluorescente <i>in situ</i> .....</b>	<b>117</b>
Resumo.....	117
Abstract.....	118
Introdução .....	119
Material e Métodos .....	120
Resultados e Discussão .....	123
Conclusão.....	126
Referências.....	127
<b>IX – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>130</b>



## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo III</b>	
Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	30
Tabela 2 - Desempenho ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	34
Tabela 3 - Peso relativo (%) dos órgãos do trato gastrointestinal e comprimento do intestino delgado (cm) ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP).....	36
Tabela 4 - Altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ ) e relação altura de vilo:profundidade de cripta (V:C) ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP)....	38
Tabela 5 – Atividade das dissacaridases intestinais (U/mg de proteína) ( $\pm$ erro padrão) nos diferentes segmentos do intestino delgado ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP).....	40
Tabela 6 – Atividade da lipase (UI/mg de proteína), amilase (UA/ $\mu\text{g}$ de proteína), tripsina (nmol/ $\mu\text{g}$ de proteína) e quimiotripsina (nmol/ $\mu\text{g}$ de proteína) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	41
Tabela 7 - Rendimento de carcaça (%) e de cortes (%) ( $\pm$ erro padrão) de frangos abatidos aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP) .....	42
Tabela 8 - Colesterol total (mg dL <sup>-1</sup> ), triglicérides (mg dL <sup>-1</sup> ), alanina aminotransferase (ALT) (U/I) e aspartato aminotransferase (AST) (U/I) ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP) .....	43
<b>Capítulo IV</b>	
Tabela 1- Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	53
Tabela 2 - Desempenho ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	56
Tabela 3 - Peso relativo (%) dos órgãos do trato gastrointestinal e comprimento do intestino delgado (cm) ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta.....	58

Tabela 4 - Altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ ) e relação altura de vilo:profundidade de cripta ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta.....	60
Tabela 5 – Atividade das dissacaridases intestinais (U/mg de proteína) ( $\pm$ erro padrão) nos diferentes segmentos do intestino delgado ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta.....	62
Tabela 6 – Atividade da lipase (UI/mg de proteína), amilase (UA/ $\mu\text{g}$ de proteína), tripsina (nmol/ $\mu\text{g}$ de proteína) e quimiotripsina (nmol/ $\mu\text{g}$ de proteína) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	63
Tabela 7 - Rendimento de carcaça (%) e de cortes (%) ( $\pm$ erro padrão) de frangos abatidos aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta. ....	64
Tabela 8 - Colesterol total (mg dL-1), triglicérides (mg dL-1), alanina aminotransferase (ALT) (U/I) e aspartato aminotransferase (AST) (U/I) ( $\pm$ erro padrão) de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	65

#### Capítulo V

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	73
Tabela 2 – Peso relativo $\pm$ erro padrão (%) de timo, baço e bolsa cloacal de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	76
Tabela 3 – Valores hematológicos (%) e a relação heterófilo:linfócito (H:L) $\pm$ erro padrão de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	77
Tabela 4 – Atividade fagocítica (%), hemácias fagocitadas e produção de óxido nítrico $\pm$ erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	79
Tabela 5 – Reação interdigital a fitohemaglutinina (mm) $\pm$ erro padrão em frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	80
Tabela 6 – Título de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ ) $\pm$ erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	82

#### Capítulo VI

Tabela 1 – Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	91
Tabela 2 – Peso relativo $\pm$ erro padrão (%) de timo, baço e bolsa cloacal de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	94
Tabela 3 – Valores hematológicos (%) e a relação heterófilo:linfócito (H:L) $\pm$ erro padrão de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	95

Tabela 4 – Atividade fagocítica (%), hemácias fagocitadas e produção de óxido nítrico $\pm$ erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	97
Tabela 5 – Reação interdigital a fitohemaglutinina (mm) $\pm$ erro padrão em frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de própolis bruta.....	98
Tabela 6 – Título de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ ) $\pm$ erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de própolis bruta.....	100

## Capítulo VII

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	108
Tabela 2 – Sondas utilizadas para processo de hibridização fluorescente <i>in situ</i> .....	110
Tabela 3 – Grupos bacterianos (% da contagem apresentada pela sonda Eub338) ( $\pm$ erro padrão) em amostras do ceco de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).....	111

## Capítulo VIII

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.....	121
Tabela 2 – Sondas utilizadas para processo de hibridização fluorescente <i>in situ</i> .....	122
Tabela 3 – Grupos bacterianos (% da contagem apresentada pela sonda Eub338) ( $\pm$ erro padrão) em amostras do ceco de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	124

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Capítulo V	
Figura 1. Superfície de resposta para a reação interdigital a fitohemaglutinina em função do nível de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP) e o tempo da análise em frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com rações contendo diferentes níveis de EEP.....	81
Capítulo VI	
Figura 1. Superfície de resposta para a reação interdigital a fitohemaglutinina em função do nível de inclusão de própolis bruta e o tempo da análise de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com rações contendo diferentes níveis de própolis bruta.....	99

## RESUMO

Foram realizados quatro experimentos para avaliar o efeito da suplementação de própolis bruta (PBr) e de extrato etanólico de própolis (EEP) sobre parâmetros zootécnicos, imunitários e microbiota cecal de frangos de corte. Exp I e II - Em cada experimento, 1020 aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com seis tratamentos e cinco repetições. Os tratamentos para o Exp. I consistiram de rações contendo 0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm de EEP e para o Exp. II rações com 0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm de PBr. As dietas foram ministradas do 1° ao 21° dia de vida das aves, sendo posteriormente, fornecida uma ração única à base de milho e farelo de soja. Exp I - A suplementação de EEP no período de um a sete dias afetou negativamente ( $P < 0,05$ ) o ganho de peso e o consumo de ração dos animais. O peso relativo do proventrículo aos sete dias apresentou comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ), com menor peso ao nível de 2865 ppm de EEP. Aos 21 dias as aves que receberam 2943 ppm e 3047 ppm de EEP apresentaram melhores índices ( $P < 0,05$ ) quanto a profundidade de cripta e relação vilos:cripta no duodeno, respectivamente. Aos sete e 21 dias, observou-se comportamento linear ( $P < 0,05$ ) para a atividade da sacarase no duodeno e jejuno, respectivamente. A atividade das enzimas pancreáticas não foi afetada ( $P > 0,05$ ). Não houve melhorias quanto ao rendimento de carcaça e de cortes, porém, observou-se redução ( $P < 0,05$ ) da porcentagem de gordura abdominal. Não foram observadas alterações ( $P > 0,05$ ) para colesterol total, triglicérides e para a enzima alanina aminotransferase (ALT), no entanto, a enzima aspartato aminotransferase (AST) apresentou comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ), com menor atividade ao nível de 3735 ppm de EEP. A inclusão de 1000 a 5000 ppm de EEP na dieta pré-inicial de frangos de corte compromete o desempenho nesta fase, provavelmente pela diminuição na atividade da sacarase. No entanto, o EEP melhorou a morfometria intestinal aos 21 dias e não afetou o desempenho e rendimento de carcaça aos 42 dias. Exp II - A suplementação de PBr não afetou ( $P > 0,05$ ) o ganho de peso, o consumo de ração e a conversão alimentar. Aos sete e 21 dias, observou-se comportamento linear e quadrático ( $P < 0,05$ ) para peso relativo da moela e intestino grosso, respectivamente, com menor peso do intestino grosso ao nível de 278 ppm de PBr. Aos 21 dias, observou-se comportamento quadrático para profundidade de cripta no íleo, com maior valor ao nível de 323 ppm de PBr. Observou-se efeito linear crescente ( $P < 0,05$ ) para sacarase no jejuno e efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) para maltase no íleo aos 21 dias, com maior atividade ao nível de 292 ppm de PBr. Com relação às enzimas pancreáticas somente a amilase reduziu sua atividade ( $P < 0,05$ ) nos níveis de 100 e 300 ppm de PBr aos 21 dias de idade. A suplementação da PBr proporcionou efeito linear positivo ( $P < 0,05$ ) sobre o rendimento de carcaça, no entanto,

não alterou ( $P>0,05$ ) o rendimento de cortes. Não foram observadas modificações ( $P>0,05$ ) quanto ao nível de triglicérides, ALT e AST, no entanto, os níveis de 400 e 500 ppm de PBr apresentaram maiores ( $P<0,05$ ) níveis de colesterol quando comparados ao controle. A adição de PBr nas rações não influenciou os parâmetros de desempenho, apesar dos benefícios quanto ao rendimento de carcaça e morfofisiologia intestinal. Exp. III e IV – Foram utilizados 192 e 168 pintos de corte, respectivamente, criados em gaiolas de metabolismo até aos 21 dias de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com seis tratamentos, oito repetições para o EEP e sete repetições para a PBr. As dietas experimentais corresponderam às mesmas utilizadas no Exp I e II. Exp III - A inclusão de EEP proporcionou efeito quadrático ( $P<0,05$ ) para peso relativo do baço e bolsa cloacal, com os menores pesos ao nível de 2946 e 2985 ppm, respectivamente. Observou-se redução ( $P<0,05$ ) na porcentagem de monócito para o nível de 3000 ppm de EEP quando comparado ao controle. A atividade fagocítica dos macrófagos, número médio de hemácias fagocitadas e produção de óxido nítrico não foram alterados ( $P>0,05$ ). A reação interdigital a fitohemaglutinina apresentou comportamento linear negativo e quadrático ( $P<0,05$ ) em função do tempo e dos níveis de inclusão, respectivamente, observando o menor valor com 3074 ppm de EEP. Os animais apresentaram aumento linear ( $P<0,05$ ) dos anticorpos séricos contra a doença de Newcastle. O EEP mostrou ser capaz de proporcionar melhor resposta imune humoral. Com relação à microbiota cecal, a inclusão de EEP proporcionou decréscimo linear ( $P<0,05$ ) na concentração do grupo *Gammaproteobacteria*. Quando comparado cada nível de inclusão com o tratamento controle foi observado aumento ( $P<0,05$ ) na proporção deste grupo no nível de 1000 ppm de EEP. Quanto aos grupos *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Lactobacillus* spp. e *Enterobacteriaceae* não foram observados diferenças ( $P>0,05$ ). A inclusão de EEP nas dietas reduziu a população de *Gammaproteobacteria* nos cecos de frangos de corte. Exp. IV - A inclusão de PBr não afetou ( $P>0,05$ ) os pesos relativos dos órgãos linfóides e a produção de anticorpos séricos contra a doença de Newcastle. Observou-se comportamento quadrático ( $P<0,05$ ) para a atividade fagocítica dos macrófagos, com menor atividade ao nível de 351 ppm de PBr. Quando comparado cada nível de inclusão com o controle observou-se maior atividade fagocítica ( $P<0,05$ ) e maior número de hemácias fagocitadas ( $P<0,05$ ) nos níveis contendo 100 ppm e 500 ppm de PBr, respectivamente. A reação interdigital a fitohemaglutinina apresentou comportamento quadrático ( $P<0,05$ ) em função do tempo e dos níveis de inclusão, sendo que o nível de 275 ppm de PBr e o tempo de 39,35 horas resultou no menor e maior valor da reação. A PBr mostrou ser capaz de proporcionar melhor resposta imune mediada por células. Com relação à microbiota cecal, a inclusão da PBr proporcionou efeito quadrático ( $P<0,05$ ) com relação ao grupo *Clostridiaceae*, com menor porcentagem ao nível de 244 ppm. Além disso, a população de *Lactobacillus* spp. e *Enterobacteriaceae* apresentaram aumento e decréscimo linear ( $P<0,05$ ), respectivamente. A porcentagem de *Clostridiaceae* reduziu ( $P<0,05$ ) com relação ao tratamento controle nos animais alimentados com 100, 200, 300 e 400 ppm de PBr. Em adição, o nível de 200 ppm ocasionou redução ( $P<0,05$ ) dos *Lactobacillus* spp. com relação ao tratamento controle. Quanto aos grupos *Bacteroidaceae* e *Gammaproteobacteria* não foram observados diferenças ( $P>0,05$ ). A suplementação de PBr nas dietas aumentou a população das bactérias estritamente benéficas e reduziu as potencialmente nocivas.

**Palavras-chave:** aditivo natural, desempenho, modulador de desempenho, resposta imune humoral, resposta imune celular, sistema imune

## ABSTRACT

Four experiments were carried out aiming to evaluate the supplementation effect of crude propolis (PBr) and ethanolic extract of propolis (EEP) on zootechnical, immune parameters and cecal microbiota of broilers chickens. Exp I and II - In each experiment, 1,020 birds were distributed in a completely randomized design, with six treatments and five replicates. Treatments in Exp I consisted of diets containing 0, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 ppm of EEP and for the Exp II the diets contained 0, 100, 200, 300, 400 and 500 ppm of PBr. The experimental diets were administered from the 1<sup>st</sup> to the 21<sup>st</sup> day of life, and after this period a diet based on corn and soybean meal was provided. Exp I – The supplementation of the EEP in the period from the 1<sup>st</sup> to the 7<sup>th</sup> day negatively affected ( $P<0.05$ ) weight gain and feed intake of animals. The relative proventriculus weight in the seventh day showed a quadratic behavior ( $P<0.05$ ), with lowest weight at the level of 2865 ppm of EEP. At the 21<sup>st</sup> day, the birds supplemented with EEP at the levels of 2943 and 3047 ppm had higher rates ( $P<0.05$ ) regarding crypt depth and villus-to-crypt ratio in the duodenum, respectively. On the 7<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> days there was a linear response ( $P<0.05$ ) for duodenal and jejunum sucrose activity, respectively. The pancreatic enzyme activity was unaffected ( $P>0.05$ ). Although no improvements occurred on carcass and cuts yield, a reduction was observed ( $P<0.05$ ) on the percentage of abdominal fat. No changes were observed ( $P>0.05$ ) for total cholesterol, triglyceride and alanine aminotransferase enzyme (ALT), however, the aspartate aminotransferase enzyme (AST) showed a quadratic behavior ( $P<0.05$ ), with lower activity at the level of 3735 ppm of EEP. The supplementation of the broiler pre-starter diet with 1000-5000 ppm of the EEP impaired performance at this stage, most likely due to the decreased in the sucrose activity. However, the EEP improved intestinal morphometry at 21 days and did not affect the performance or carcass yield at 42 days. Exp II - The PBr supplementation did not affect ( $P>0.05$ ) weight gain, feed intake and feed conversion. On the 7<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> days there was a linear and quadratic behavior ( $P<0.05$ ) for relative weight of gizzard and large intestine, respectively, with lower weight of the large intestine at the level of 278 ppm of PBr. On the 21<sup>st</sup> day there was a quadratic behavior to crypt depth in the ileum, with the highest value found at the level of 323 ppm of PBr. On the 21<sup>st</sup> day there was a linear increase response ( $P<0.05$ ) for sucrose in the jejunum and a quadratic response ( $P<0.05$ ) for maltase in the ileum, which higher activity predicted at a dose of 292 ppm of crude propolis. In relation to pancreatic enzymes, amylase activity was the only one reduced ( $P<0.05$ ) in animals fed with 100 and 300 ppm of crude propolis at 21<sup>st</sup> days. The PBr supplementation gave a positive linear effect ( $P<0.05$ ) on carcass yield, however, it did not affect ( $P>0.05$ ) the yield of cuts. No changes were observed ( $P>0.05$ ) in triglyceride level, ALT and AST

activities, however, treatments with 400 and 500 ppm of PBr had higher ( $P<0.05$ ) cholesterol levels compared to control. The addition of PBr in the diets did not influence the performance parameters, despite the benefits regarding carcass yield and intestinal morphophysiology. Exp III and IV - 192 and 168 broilers were used, respectively, they were raised in metabolism cages until the 21st day. The birds were distributed in a completely randomized design with six treatments and eight replicates for EEP and seven replicates for PBr. The experimental diets corresponded to the same used in the Exp I and II. In the Exp III - The inclusion of the EEP gave a quadratic effect ( $P<0.05$ ) for relative weight of spleen and cloacal bursa, with the lowest weights at the level of 2946 ppm and 2985 ppm of EEP, respectively. It was observed a reduction ( $P<0.05$ ) in the percentage of monocyte to the inclusion of 3000 ppm of EEP when compared to control. The phagocytic activity of the macrophages, the average number of the phagocytized red cells and nitric oxide production were not affected ( $P>0.05$ ). The interdigital response to phytohemagglutinin showed negative linear and quadratic behavior ( $P<0.05$ ) as a function of time and levels of inclusion, respectively, being the smallest value of the reaction with the level of 3074 ppm of EEP. The animals showed a linear increase ( $P<0.05$ ) of serum antibodies against Newcastle disease. The EEP showed to be able to provide better humoral immune response. In relation to cecal microbiota, the inclusion of EEP gave a linear decrease ( $P<0.05$ ) on the *Gammaproteobacteria* population. There was an increase ( $P<0.05$ ) in the percentage of occurrence of *Gammaproteobacteria* group to the inclusion of 1000 ppm of EEP when compared to control. There was no difference ( $P>0.05$ ) in the percentage of *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Lactobacillus* spp. and *Enterobacteriaceae* group. The supplementation of EEP in the diets was able to decrease the population of *Gammaproteobacteria* in the ceca of broiler chickens. In the Exp IV - The inclusion of PBr did not affect ( $P>0.05$ ) relative weights of lymphoid organs and the production of serum antibodies against Newcastle disease. There was a quadratic behavior ( $P<0.05$ ) for the phagocytic activity of macrophages, with lower activity level of 351 ppm of PBr. When each level of inclusion was compared to the control it was observed that the treatments containing 100 ppm and 500 ppm of PBr had higher phagocytic activity ( $P<0.05$ ) and higher number of phagocytosed red cells ( $P<0.05$ ), respectively. The interdigital response to phytohemagglutinin showed a quadratic behavior ( $P<0.05$ ) in function of time and of the inclusion level, and the level of 275.45 ppm of PBr and the time of 39.35 hours resulted in the lowest and highest reaction values. The PBr showed to be able to provide better cell-mediated immune responses. In relation to cecal microbiota, the inclusion of PBr gave a quadratic effect ( $P<0.05$ ) for the group *Clostridiaceae*, with the lowest percentage at the level of 244 ppm. Moreover, the population of *Lactobacillus* spp. and *Enterobacteriaceae* showed linear increase and decrease ( $P<0.05$ ), respectively. There was a reduction ( $P<0.05$ ) in the percentage of *Clostridiaceae* group to the inclusion level of 100, 200, 300 and 400 ppm of PBr when compared to control. In addition, the level of 200 ppm gave a reduction ( $P<0.05$ ) in the proportion of *Lactobacillus* spp. in relation to the control treatment. There was no difference ( $P>0.05$ ) in the *Bacteroidaceae* and *Gammaproteobacteria* group. The supplementation of PBr in diets was able to increase the strictly beneficial bacteria and reduce the potentially harmful.

**Key words:** cellular immune response, humoral immune response, immune system, natural additive, performance, performance modulator



## I – INTRODUÇÃO

A cadeia avícola tem apresentado elevado crescimento quando comparada às demais áreas do agronegócio (Avisite, 2011). Segundo a Agência das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em 2011, os Estados Unidos continuaram a ocupar o primeiro lugar no ranking de produção, seguido pela China e Brasil, sendo que juntos esses países são responsáveis por cerca da metade da produção mundial de carne de frango (Avicultura Industrial, 2011).

As expressivas estatísticas econômicas se devem, não somente aos avanços na genética dos animais, mas também a sanidade, nutrição, ambiência e a tecnologia de equipamentos. No âmbito nutricional, para manter esta eficiência, os nutricionistas lançam mão de compostos aditivos nas rações, como os antibióticos, com o objetivo de aumentar a produtividade animal e reduzir os custos de produção (Araujo et al., 2007). No entanto, pela possibilidade desses aditivos serem capazes de ocasionar resistência bacteriana, aliada à pressão dos consumidores por produtos saudáveis e principalmente que não ofereçam riscos à saúde humana, a suplementação desses ingredientes nas rações foi suspensa em diversos países (Dibner & Richards, 2005; Han et al., 2010).

Neste sentido a própolis, produto apícola com seus inúmeros efeitos biológicos e farmacêuticos, tem despertado interesse dos pesquisadores. Esta substância resinosa e balsâmica é produzida pelas abelhas pela combinação de extratos extraídos de plantas, cera, pólen, enzimas e secreções salivares (Lofty, 2006; Lustosa et al., 2008). As ações farmacológicas mundialmente conhecidas como antibacteriana, antiviral, antitumoral, imunomodulatória, entre outras (Marcucci, 1996; Menezes, 2005) são atribuídas a sua complexa composição química que inclui: polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos,

aldeídos aromáticos, ésteres, aminoácidos, minerais e vitaminas (Bankova et al., 2000; Pereira et al., 2002; Lustosa et al., 2008).

Tendo em vista a importância medicinal que a própolis tem apresentado, esse ingrediente natural tem demonstrado potencial para substituir os comumente utilizados antibióticos, na produção animal.

## **1.1 REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1.1 Uso de aditivos sintéticos e naturais em rações de frangos de corte**

O surgimento dos criatórios comerciais de aves permitiu a produção em larga escala da carne de frango. No entanto, as instalações utilizadas correlacionadas com a alta densidade de criação favoreceram um aumento na incidência de enfermidades. O uso de antibióticos, substâncias produzidas por fungos, leveduras ou bactérias, com o objetivo de reduzir possíveis efeitos de doenças, tornou-se necessário (Brumano & Gattás, 2009).

Porém, foi observado que além de prevenir doenças os antibióticos, em doses subterapêuticas, são capazes de aumentar o desempenho e a eficiência alimentar dos animais (Niewold, 2007). Assim, a partir dos anos 1950, o setor avícola começou a utilizar os melhoradores de desempenho em larga escala (Rocha et al., 2010), tornando-se dependente da utilização destes compostos para garantir os índices produtivos.

Os antibióticos podem agir de maneira diferenciada sobre o desempenho e a eficiência alimentar dos animais (Miles et al., 2006). Existe um consenso que o mecanismo de ação está relacionado a alterações na microbiota intestinal, considerando que alguns não são absorvidos pelo organismo animal (Dibner & Richards, 2005). A utilização destes medicamentos permite uma redução de patógenos oportunistas, inibindo a produção de toxinas por essas bactérias e a competição por nutrientes com o hospedeiro (Sarica et al., 2005).

A inclusão de doses subterapêuticas de antibióticos nas rações animais com função de promover o crescimento é o centro de diversas discussões por causa da preocupação a respeito da permanência de resíduos na carne, que em hipótese poderiam ser transmitidos aos consumidores, propiciando o desenvolvimento de bactérias resistentes às moléculas presentes nos antibióticos que possuem semelhanças àqueles utilizados na terapia humana (Fukayama et al., 2005; Castanon, 2007). A presença de

resíduos de antibióticos na carne poderia ainda ocasionar riscos à saúde humana pela ocorrência de possíveis reações de hipersensibilidade ou até mesmo câncer, tornando um fator de preocupação de saúde pública (Faria-Filho et al., 2006).

Apesar destes questionamentos, até o momento não existem dados científicos que permitam concluir que o aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos em humanos seja pela contaminação por alimentos derivados de animais alimentados com os antibióticos. Acredita-se que apesar de alguns antibióticos serem utilizados tanto em animais quanto na terapia humana, a maior parcela do problema do fenômeno biológico da resistência bacteriana seja por causa do uso indiscriminado destas substâncias pelos próprios seres humanos (Phillips et al., 2004).

Uma análise de dados sobre bactérias, de importância na medicina humana, resistentes a antimicrobianos, demonstrou que dentre as 20 bactérias que apresentaram resistência aos antibióticos, 12 delas não podem ser relacionadas com a utilização de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal, uma vez que estas não podem ser adquiridas via cadeia alimentar. Das remanescentes, assume-se que a transferência de cepas bacterianas resistentes a partir dos animais para os humanos em todos os casos seja de apenas 1%, ou menos (Bywater & Casewell, 2000).

Apesar da não confirmação da correlação entre o uso de antimicrobianos na produção animal e o desenvolvimento de resistência em microrganismos isolados de seres humanos, como medida de precaução, programas de controle sobre a utilização de antibióticos na nutrição animal começaram a ser utilizados desde 1986 na Suécia e 1999 na Suíça (Wenk, 2003).

Frente aos possíveis riscos a saúde e por influência da opinião pública, em que o consumidor busca constantemente produtos seguros, de qualidade e de custo acessível, os antibióticos com uso de aditivo alimentar foram completamente banidos na Europa em 2006 (Castanon, 2007). No caso do Brasil, alguns antimicrobianos como moduladores de desempenho possuem seu uso autorizado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), dentre eles são citados: avilamicina, bacitracina metileno disalicilato, bacitracina de zinco, colistina, clorexidina, enramicina, flavomicina, halquinol, tilosina e virginamicina (Haese & Silva, 2004; MAPA, 2008). No entanto, o seu uso representa um entrave para o mercado exportador, uma vez que a utilização destes produtos está proibida nos principais países.

O Brasil, sendo o maior exportador mundial de carne de frango (Avisite, 2011), precisa atender as exigências dos países importadores, buscando alternativas que possam substituir estas substâncias. Neste contexto, dentre as possíveis alternativas destacando-se o uso de probióticos, prebióticos, simbióticos, ácidos orgânicos e extratos vegetais.

Os probióticos e prebióticos diferem quanto ao mecanismo de ação no organismo. Probióticos são aditivos alimentares compostos por microrganismos vivos não patogênicos que proporcionam o equilíbrio da microbiota intestinal pela adição de microrganismos benéficos na ração (Fuller, 1989). Além disso, podem influenciar no desenvolvimento e na proteção da mucosa intestinal (Awad et al., 2009). Por outro lado, os prebióticos são carboidratos não digeríveis que atuam como substrato para as bactérias benéficas do trato gastrointestinal, promovendo melhorias na microbiota por estimular o crescimento e a atividade dessas bactérias (Gibson & Roberfroid, 1995). Os simbióticos são conhecidos como a associação de probióticos e prebióticos, atuando tanto na implantação de bactérias benéficas quanto na sua sobrevivência no trato gastrointestinal (Awad et al., 2009).

Resultados controversos são descritos quando da utilização destes aditivos na alimentação animal, demonstrando efeitos benéficos (Awad et al., 2009; Rocha et al., 2010; Silva et al., 2011) ou nenhuma mudança significativa na performance dos animais (Pedroso et al., 2003; Pelicano et al., 2004).

A eficácia destes aditivos pode variar de acordo com a idade do animal, condições de armazenamento, manejo e sanidade das instalações e no caso dos probióticos as diferentes cepas e características dos microrganismos que são incorporados ao produto e a viabilidade dos mesmos no momento de utilização (Corrêa et al., 2003; Mahdavi et al., 2005).

Os ácidos orgânicos, quando adicionados às rações, podem reduzir o pH gástrico, interferindo, desta forma, na microbiota intestinal, evitando a colonização por bactérias indesejáveis e melhorando a performance dos animais (Garcia et al., 2000). Além deste efeito, podem alterar o transporte de nutrientes e a síntese de compostos pelas bactérias, como os ácidos graxos de cadeia curta. Esses compostos possuem ação antibacteriana por também serem capazes de reduzir o pH gástrico (Corrier et al., 1990; Costa et al., 2011).

Recentemente, atenção especial é dada aos extratos vegetais como os óleos essenciais de orégano, tomilho, canela, cravo, pimenta e a própolis. Acredita-se que os componentes presentes em maior concentração nas plantas de origem como: carvacrol, timol, cinamaldeído, eugenol, capsaicina e flavonoides (Franco et al., 2007; Santurio et al., 2007; Rizzo et al., 2010), estimulam a digestão, aumentando a absorção dos nutrientes, alteram a microbiota intestinal, favorecendo as bactérias benéficas e possuem efeito imunomodulador (Bonato et al., 2008).

Diante dos fatos expostos, levando em consideração as exigências do mercado consumidor mundial, a procura por produtos alternativos que possam substituir os antibióticos é, sem dúvida, uma das linhas de pesquisa estudadas atualmente. No sentido de aprimoramento de resultados e para que os novos produtos sejam aceitos comercialmente, estudos adicionais devem ser realizados com os animais de produção.

#### 1.1.2 Própolis – aspectos gerais

Própolis, material resinoso e balsâmico, elaborado naturalmente pelas abelhas, é proveniente de flores, ramos, brotos, exsudatos e de outras partes do tecido vegetal (Barth et al., 1999). Durante o processo de coleta do material, as abelhas processam e modificam o produto pela adição de ceras, tornando-o moldável e de fácil utilização, e secreções salivares (Santos et al., 2003), como a enzima glicosidase aumentando sua ação farmacológica (Stradiotti et al., 2004). A palavra própolis tem origem Grega e significa *pro*, em defesa de, e *polis* a cidade, sendo, desta forma, utilizada em defesa da colmeia (Salatino et al., 2005).

A própolis coletada pelo apicultor se encontra na forma bruta sendo necessário um processo de extração e purificação dos compostos, pelo uso de solventes, como o álcool de cereais, óleos vegetais e metanol, processo este que pode variar de semanas a meses (Inoue et al., 2007; Sforcin, 2007; Buriol et al., 2009; Tekeli et al., 2010).

Quanto às características físico-químicas da própolis brasileira, esta pode ser dividida, considerando as regiões do país, em 12 grupos, pertencendo cinco a região Sul, uma ao Sudeste e seis diferentes ao Nordeste (Park et al., 2000). Mais recentemente, foi identificado na região Norte a própolis vermelha, sendo assim denominada, pela sua coloração característica (Trusheva et al., 2006). A coloração normalmente encontrada vai do tom esverdeado até o marrom avermelhado, sendo que o odor é característico em

virtude da fração volátil de ácidos fenólicos, mas pode variar dependendo da amostra (Marcucci, 1996; Banskota et al., 2001).

A própolis bruta é composta basicamente por resinas e bálsamos, ceras, óleos essenciais e grãos de pólen (Funari & Ferro, 2006). Utilizando solventes orgânicos é possível obter uma proporção de, em média, 30% de ceras e 60% de bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos (Marcucci, 1996). Além destes compostos, elementos como minerais (Cu, Mn, Fe, Ca, Al, V, Si) e vitaminas do complexo B (B1, B2 e B6), C e E também podem ser encontrados (Menezes, 2005; Marcucci, 1996).

A variabilidade quanto à composição química depende de fatores como a flora local, características climáticas e geográficas e a genética das abelhas (Bankova, 2005; Sousa et al., 2007), podendo aumentar a atividade de coleta em determinadas épocas (Inoue et al., 2007).

Um exemplo da biodiversidade são as diferentes fontes botânicas disponíveis. Nas zonas temperadas a principal é o broto de álamo (*Populus nigra*), nas zonas tropicais, como é o caso do Brasil, a diversidade é ainda maior, a própolis produzida no cerrado é conhecida internacionalmente como própolis verde e considerada que o alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) seja a sua principal fonte vegetal (Salomão et al., 2004; Bankova, 2005; Sousa et al., 2007; Chang et al., 2008). No entanto, estudos disponíveis na literatura identificam outras possíveis contribuições, como de espécies de *Araucaria* (Bankova et al., 1998).

Desta forma, em razão da variação na composição química, torna-se difícil a padronização do tipo e concentração dos compostos e, conseqüentemente, a qualidade do produto. Entretanto, independente destas diferenças, a própolis possui as mesmas atividades biológicas, pois este é o papel desempenhado nas colmeias (Trusheva et al., 2006).

O Ministério da Agricultura Pecuária e do Abastecimento (MAPA) estabelece os requisitos mínimos de qualidade que deve atender a própolis comercial, sendo considerado como parâmetros os principais constituintes, os compostos fenólicos e o grupo dos flavonoides, sendo necessária a concentração de 5% e 0,5%, respectivamente (Instrução Normativa nº3 –Anexo VI, 2001).

A importância medicinal da própolis se deve, principalmente, aos seus compostos químicos. Dentre eles, são identificados flavonoides (galangina, tectocrisina,

pinocembrina, campferol e quercetina), considerado o grupo majoritário, ácidos aromáticos, ácidos fenólicos (cafeico, ferúlico, cinâmico e cumárico), terpenoides, aldeídos, alcoóis, ácidos alifáticos e ésteres, aminoácidos, esteroides e açúcares (Bankova et al., 1992; Bankova et al., 2000).

Apesar de considerar os flavonoides responsáveis pelas propriedades terapêuticas, sendo usados como índice para qualificar os produtos (Williams et al., 2004) tem se demonstrado que o potencial biológico se deve a um sinergismo entre todos os seus constituintes (Marcucci, 1996).

Dentre as principais atividades biológicas são citadas as antimicrobianas (Fernandes Júnior et al., 2006), antioxidantes (Cabral et al., 2009), anti-inflamatórias (Almeida & Menezes, 2002), antivirais (Marcucci, 1996) e o efeito imunomodulador (Fischer et al., 2008), dentre outras.

Assim, o uso de aditivos na alimentação animal, que contêm substâncias que podem ocasionar benefícios à saúde, vem se tornando interessante do ponto de vista dos nutricionistas. A capacidade destes compostos interferirem na comunidade microbiana, e conseqüentemente proporcionar melhorias no desempenho e *status* imunitário do animal, é a propriedade biológica que mais vem sendo pesquisada atualmente.

### 1.1.3 Efeito modulador de desempenho

O desempenho produtivo dos animais pode ser melhorado através da administração de aditivos naturais (Rahmani & Speer, 2005; Tatli Seven et al., 2008). A própolis possui em sua composição química flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos e ácidos fenólicos, estes compostos são considerados responsáveis por atividades biológicas de grande interesse, como antimicrobiana (Shalmany & Shivazad, 2006). Estas substâncias podem melhorar a saúde intestinal e aumentar a capacidade digestiva e absorviva dos animais (Denli et al., 2005).

Neste contexto, Shalmany & Shivazad (2006) observaram que o extrato da própolis até o nível de 250 ppm melhorou o desempenho de frangos de corte. Da mesma forma, Tatli Seven et al. (2008) reportaram que em situações de estresse calórico a própolis proporcionou melhores índices produtivos e qualidade de carcaça. No entanto, Franco et al. (2007) estudando o efeito do extrato etanólico de própolis até o nível de 0,3%, não observaram melhorias sobre o desempenho dos animais. Estes resultados

evidenciam a necessidade de estudos adicionais para verificar o real efeito destes aditivos.

A eficácia da própolis como um modulador de desempenho pode ser potencializada pelas mudanças na morfologia intestinal, sendo um bom indicador da resposta do organismo as substâncias biologicamente ativas presentes nas dietas (Viveros et al., 2011). Assume-se que características como comprimento do trato, altura, largura e densidade das vilosidades podem ser melhoradas com a utilização de aditivos nas dietas (Pelicano et al., 2005; Miles et al., 2006; Awad et al., 2009).

De fato é comprovado que os ingredientes naturais, como por exemplo, prebióticos, ácidos orgânicos e subprodutos da uva são capazes de melhorar os índices histológicos da mucosa intestinal, aumentando altura das vilosidades, reduzindo profundidade de cripta e desta forma melhorando a relação altura de vilo e profundidade de cripta (Santin et al., 2001; Pelicano et al., 2007; Sayrafi et al., 2011; Viveros et al., 2011). A menor profundidade de cripta está correlacionada com a menor necessidade de renovação celular (Oliveira et al., 2008), reduzindo gasto energético e proteico para esta síntese, disponibilizando para o crescimento de outros tecidos corporais (Miles et al., 2006). Em adição, a maior relação vilo:cripta sugere uma maior capacidade digestiva e absorptiva dos nutrientes (Silva et al., 2009).

Os efeitos benéficos quanto aos parâmetros histológicos intestinais são por causa do controle da proliferação de bactérias patogênicas, responsáveis por danos à mucosa e redução das dimensões das vilosidades, e promoção do desenvolvimento de bactérias benéficas, evitando assim, que funções digestivas e absorptivas sejam prejudicadas (Sayrafi et al., 2011). A melhora na morfologia intestinal pode ser considerada um efeito indireto alcançado pela estabilidade microbiana no intestino (Windisch et al., 2007).

O trato gastrointestinal é formado por inúmeros microrganismos, sendo as bactérias consideradas o grupo majoritário (Gabriel et al., 2006), possuindo papel determinante na manutenção da saúde do hospedeiro, por fazer parte de processos nutritivos, destoxificação de compostos, proteção contra bactérias patogênicas e, conseqüentemente, influenciar a performance produtiva dos animais (Amit-Romach et al., 2004). Portanto, a estabilidade desta comunidade é essencial para o desenvolvimento destas atividades.



No entanto, a diversidade microbiana pode ser influenciada por diversos fatores, como dieta (Pang et al., 2009), características do meio ambiente em que os animais estão inseridos (Burkholder, et al., 2008; Torok et al., 2009), sexo, idade (Lumpkins et al., 2008), utilização de aditivos melhoradores de desempenho (Li et al., 2009), dentre outros. Além disso, a composição bacteriana varia ao longo do trato gastrointestinal. No intestino delgado há predominância de *Lactobacillus* e nos cecos espécies anaeróbicas e em menor número, bactérias facultativas (Lu et al., 2003).

Esta variada microbiota pode ser dividida em bactérias potencialmente patogênicas ou aquelas benéficas, sendo que o efeito, por elas desencadeadas, ficam dependentes da concentração e espécie das mesmas. Neste sentido, estudos correlacionam a microbiota com o aumento da capacidade de captação de energia, deposição de gordura, peso corporal e ganho de peso (Backhed et al., 2004; Turnbaugh et al., 2006; Santacruz et al., 2010). Têm-se comprovado que humanos obesos possuem diferenciada população microbiana quando comparados a indivíduos magros, apresentando maiores proporções do gênero *Firmicutes* (Santacruz et al., 2010). Assim, a utilização de aditivos que possam modular a microbiota intestinal favorecendo bactérias capazes de extrair calorias extras da dieta podendo ser usada posteriormente como energia (Bajzer & Seeley, 2006), é de grande importância para o metabolismo, melhorando conseqüentemente o desempenho dos animais.

Estudos demonstram efeito da própolis sobre diversas bactérias (Marcucci, 1996; Fernandes Júnior et al., 2006), sendo em sua maioria Gram-positivas, fato este pelas possíveis diferenças na constituição química da parede celular, sendo esta de estrutura mais complexa nas bactérias Gram-negativas (Pinto et al., 2001), além de possuir um maior teor lipídico (Vargas et al., 2004). Portanto, as modificações na microbiota intestinal, aliadas as melhores condições de saúde dos animais, podem ser responsáveis pelos resultados positivos reportados quanto ao desempenho de frangos de corte alimentados com própolis (Shalmany & Shivazad, 2006).

No entanto, os mecanismos de ação dos metabólitos presentes na própolis sobre o organismo animal ainda não estão totalmente elucidados. Citam-se como prováveis, a inibição da aderência (Selma et al., 2009), prevenção da divisão celular e da síntese proteica em bactérias patogênicas (Takasi-Kikuni & Schilcher, 1994) e o controle seletivo do crescimento de bactérias comensais (Laparra & Sanz, 2010). Outro possível

modo de ação seria a capacidade dos microrganismos presentes no trato gastrointestinal de metabolizar os compostos presentes na própolis, como os polifenóis, que serviriam como substrato nutricional, fornecendo energia extra às bactérias (García-Ruiz et al., 2008).

Além da influência sobre a performance obtida através da modificação da microbiota e morfologia intestinal, espera-se da própolis um efeito modulador de crescimento, por causa dos flavonoides, compostos em maior concentração, possuírem um grupamento hidroxil da aglicona posicionado similarmente aos estrógenos (Havsteen, 2002).

Deste modo, em virtude da provável habilidade de modulador de desempenho dos ingredientes naturais, presentes em plantas e seus extratos, estudos são realizados para se comprovar a eficácia destas substâncias na manipulação da comunidade microbiana, com o objetivo de melhorar a saúde intestinal, refletindo diretamente sobre os índices produtivos.

Levando em consideração a complexidade desta estrutura, os métodos baseados em cultura usualmente utilizados para determinar a influência da dieta sobre a microbiota se mostram ineficazes por possuírem limitações na identificação dos organismos, porque apenas uma parcela desta comunidade, 10 a 60%, é passível de ser cultivada (Lu et al., 2003; Gong et al., 2007). Além disso, é um processo trabalhoso e demorado, sendo necessário manter condições ambientais específicas de crescimento e utilizar meios que podem não respeitar a seletividade de determinadas bactérias (Franks et al., 1998; Amit-Romach et al., 2004).

Recentemente, técnicas moleculares utilizando material genético (DNA e RNA) têm permitido a identificação de diferentes populações sem a necessidade dos meios convencionais (Viveros et al. 2011), demonstrando que a complexidade da estrutura microbiana é ainda maior do que se imaginava, por conseguir enquadrar na análise o habitat total presente no trato gastrointestinal (Gong et al., 2007).

Dentre as técnicas moleculares utilizadas atualmente, a hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) é um método direto que permite a identificação da composição microbiana (Zhu & Joergert, 2003), por meio da marcação por sondas específicas que levam em consideração a sequência dos ácidos nucleicos do organismo em questão (Bagarelli & Oliani, 2004).

A técnica consiste na formação de ligações estáveis entre as sondas utilizadas e a região 16S rRNA nos ribossomos, local em que ocorre a tradução e a síntese de proteínas do organismo a ser estudado (Martinez et al., 2006). Caso não ocorra o reconhecimento da sequência de ácidos nucleicos a hibridização não se concretizará e a sonda será eliminada através de subsequentes lavagens durante o processamento das amostras (Amann et al., 1990). A hibridização pode ser realizada no DNA ou RNA extraídos e isolados das amostras originais (Sahm et al., 1999) ou sobre células inteiras fixadas com solução de formaldeído (Amann et al., 1990; Zhu & Joergert, 2003), podendo ser analisada por microscópio de fluorescência (DeLong et al., 1999) ou citômetro de fluxo (Wallner et al., 1995).

Assim, a aplicação de técnicas moleculares como a hibridização *in situ* com fluorescência é reconhecida como ferramenta essencial no estudo da composição da microbiota intestinal, obtendo resultados mais acurados e de importância prática, permitindo inferir a respeito das modificações ocorridas no trato gastrointestinal do animal pela administração de aditivos.

#### 1.1.4 Efeito sobre as enzimas digestivas

As propriedades biológicas da própolis estão diretamente correlacionadas a sua complexa composição química (Pereira et al., 2002). Dentre seus constituintes, os polifenóis ganham destaque pelas evidências de sua influência sobre o metabolismo dos carboidratos e lipídios.

Uma das formas de ação é a inibição das  $\alpha$ -glicosidades no intestino delgado promovendo redução na digestão de carboidratos a monossacarídeos absorvíveis e, conseqüentemente decréscimo ou retardo na absorção destes (Matsui et al., 2004). Além disso, os compostos podem interferir no metabolismo da glicose, inibindo sua absorção no intestino, estimulando a secreção de insulina, ativando receptores de insulina, modulando a produção de glicose hepática entre outros mecanismos (Hanhineva et al., 2010).

De fato, estudos têm demonstrado que os polifenóis podem interferir nos processos digestivos, modulando a disponibilidade dos nutrientes, através da inibição das enzimas digestivas envolvidas na quebra dos carboidratos e lipídios (McDougall et al., 2009). Estes efeitos podem ser favoráveis para o metabolismo e controle de ganho

de peso (You et al., 2011). No entanto, os mecanismos inibitórios parecem diferenciar conforme a classe e estrutura dos compostos (Nomura et al., 2008).

Até o presente momento não há estudos na literatura sobre os efeitos dos polifenóis na atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. Desta forma, considerando os potenciais efeitos dos polifenóis sobre os processos digestivos se fazem necessárias pesquisas que possam verificar os efeitos de ingredientes que contenham estes compostos sobre o organismo animal. Apesar dos polifenóis serem considerados uma fonte de benefícios à saúde humana dependendo dos níveis utilizados nas dietas animais pode ser prejudicial ao desempenho dos mesmos, afetando os índices produtivos.

#### 1.1.5 Efeito sobre o perfil bioquímico

A própolis também tem despertado grande interesse dos pesquisadores por causa de seu efeito antioxidante, sendo apontada como agente antiaterogênico (Alves et al. 2008), capaz de reduzir o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumentar a lipoproteína de alta densidade (HDL) (Mesquita et al., 2007). De fato, coelhos com hipercolesterolemia induzida alimentados com extrato etanólico de própolis demonstraram queda de até 30% nos níveis de colesterol total e LDL plasmático, bem como o aumento da HDL (Fernandes et al., 2002). Alves et al. (2008) reportaram efeito semelhante sugerindo que ácidos cafeicos, constituintes da própolis, podem ser absorvidos no intestino, justificando o efeito sistêmico destes ácidos sobre o nível de colesterol.

O efeito dos compostos biologicamente ativos sobre os níveis de colesterol ocorre pela capacidade em inibir a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que entram na constituição da molécula de colesterol fazendo com que seja reconhecida pelas células alvo (Rimm et al., 1996; Mesquita et al., 2007). Além disso, as bactérias do trato gastrointestinal dos animais são capazes de hidrolisar os sais biliares conjugados no intestino, eliminando-os, sendo necessário mais colesterol hepático para a nova síntese (Kanashiro et al., 2001). Em adição, ocorre um aumento na atividade da lipase lipoproteica, enzima responsável pela hidrólise dos triglicérides, podendo beneficiar o organismo animal reduzindo seu nível sanguíneo (Oliveira et al., 2002).

Além deste efeito, os compostos da própolis podem apresentar funções hepatoprotetoras (González et al., 1995). No entanto, esta função pode ser comprometida dependendo de fatores como concentrações dietéticas e períodos de administração (Mani et al., 2006). Para detectar possíveis efeitos deletérios pela administração de aditivos sobre o organismo animal marcadores bioquímicos são utilizados, como as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).

Estas enzimas hepáticas são utilizadas para predizer o *status* metabólico do fígado, considerando que o órgão atua em diversas atividades metabólicas (Barbosa et al., 2010). Elevações nas concentrações plasmáticas podem indicar disfunções decorrentes de lesões nos hepatócitos ou por alterações na permeabilidade da membrana (Oliveira et al., 2005). Neste sentido, Kanashiro et al. (2001) não observaram influência sobre os parâmetros enzimáticos na administração contínua de probiótico a frangos de corte. Garcia et al. (2004) estudando o perfil bioquímico de coelhas jovens alimentadas com extrato etanólico de própolis também não observaram alterações importantes que pudessem indicar reações adversas a administração do ingrediente.

#### 1.1.6 Efeito imunoestimulante

Os constituintes biologicamente ativos encontrados na própolis são capazes de interagir com o organismo, influenciando tanto na resposta imune humoral quanto na celular (Ziara et al., 2005; Çetin et al., 2010; Fischer et al., 2010).

Várias são as maneiras pelas quais esta interação pode ocorrer e a ativação dos macrófagos é sugerida como uma destas possíveis ações. Estudos utilizando compostos isolados da própolis demonstraram aumento na velocidade de disseminação dos macrófagos pelo organismo animal (Dimov et al., 1991; Tatefuji et al., 1996).

Essas células possuem grande importância, estão presentes em diversos processos como fagocitose, liberação de enzimas e participação como mediadores em processos inflamatórios. Desta maneira, a própolis pode estimular a atividade dessas células por aumentar a liberação de substâncias microbicidas pelos macrófagos e induzir a produção de citocinas anti-inflamatórias (Sforcin, 2007). Sforcin et al. (2002) sugerem que macrófagos ativados produzem citocinas que agem sobre os linfócitos *Natural Killer*, primeiro mecanismo de defesa do organismo, podendo influenciar indiretamente

sobre a atividade citotóxica dessas células. Além disso, a própolis possui efeito estimulador sobre a produção de óxido nítrico, indicativo da atividade dos macrófagos, sendo considerado um eficiente mecanismo microbicida (Orsi et al., 2000; Sforcin, 2007).

A princípio, acreditou-se que a ação dos compostos seria limitada aos macrófagos, no entanto, pesquisas demonstraram que a administração de própolis também aumenta a proliferação periférica de linfócitos B (Ziaran et al., 2005; Kong et al., 2006), tendo potencial para ser utilizada como adjuvante em vacinas, aumentando a imunogenicidade, tornando desta forma, mais efetivas e com efeito mais durador (Halfen et al., 2000; Sforcin, 2007). Neste sentido, Freitas et al. (2011) e Taheri et al. (2005) observaram aumento na produção de anticorpos em poedeiras e frangos de corte alimentados com extrato hidroalcoólico e extrato oleoso de própolis, respectivamente. No entanto, este efeito parece ser dose-dependente, podendo em altas concentrações inibir certos eventos imunológicos (Orsi et al., 2005). Çetin et al. (2010) encontraram maior produção de anticorpos em poedeiras alimentadas com 3g/kg de própolis sendo este nível mais efetivo do que doses mais baixas ou mais altas. Da mesma forma, Ziaran et al. (2005) demonstraram redução na produção de anticorpos contra a doença de Newcastle em frangos alimentados com maiores níveis de inclusão (400, 700 e 1000 mg/kg) de extrato de própolis. Sendo assim, a dosagem deve ser um fator a ser considerado quanto à estimulação do sistema imune por aditivos naturais.

O mecanismo de ação dos compostos sobre a produção de anticorpos ainda é incerto, porém, acredita-se que seja em virtude do aumento da expressão de interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 (IL-2) e interferon- $\gamma$ , citocinas estas que estimulam os linfócitos B que, posteriormente, são modificados a células plasmáticas que poderão produzir anticorpos (Dimov et al., 1991; Benitez et al., 2004; Wang et al., 2006; Çetin et al., 2010).

A imunomodulação também pode ser exercida de forma indireta, pelas modificações ocorridas na microbiota intestinal (Taheri et al., 2005). As bactérias presentes no trato gastrointestinal podem estimular as células do sistema imune a secretarem citocinas e desta forma, desenvolverem respostas imunológicas (Haghighi et al., 2005).

Um exemplo da interação entre a microbiota e as respostas imunes é a importância destes microrganismos residentes no trato gastrointestinal, constituintes da barreira de defesa natural, na susceptibilidade do organismo a instalação de patógenos causadores de injúrias (Pfeiffer & Sonnenburg, 2011). Fato comprovado pelo aumento na taxa de transporte dos antígenos em toda a mucosa do intestino, na ausência de uma microbiota intestinal (Isolauri et al., 2001). Assim, a homeostase da comunidade microbiana é de suma importância para que os aspectos locais e sistêmicos da imunidade sejam preservados (Pfeiffer & Sonnenburg, 2011).

Através das informações destacadas, pode-se concluir que a própolis é um ingrediente natural com potencial para uso nas rações animais, pela atividade de modulador de desempenho e agente imunoestimulante. No entanto, o modo de ação dessas substâncias não está completamente elucidado. Assim, estudos adicionais sobre seus efeitos no organismo animal devem ser realizados, para que o produto possa ser utilizado como estratégia nutricional frente à proibição dos antibióticos.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, EC; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, n.2, 2002.
- ALVES, MJQF; MESQUITA, FF; SAKAGUTI, M et al. Efeito hipocolesterolêmico dos ácidos caféicos da própolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p. 100-105, 2008.
- AMANN, RI; BINDER, BJ; OLSON, RJ et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, p. 1919-1925, 1990.
- AMIT-ROMACH, E; SKLAN, D; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v.83, p. 1093-1098, 2004.
- ARAÚJO, JA; SILVA, JHV; AMÂNCIO, ALL et al. Uso de aditivos na alimentação de aves. **Acta Veterinária Brasileira**, v.1, n.3, p. 69-77, 2007.
- AVISITE – Estatísticas e Preços. Disponível em: <<http://www.avisite.com.br/economia>> Acesso em: 16/08/2011.
- AVICULTURA INDUSTRIAL – EUA lideram produção de frango. Disponível em: <[http://aviculturabrasileira.org/PortalGessulli/WebSite/Noticias/eua-lideram-producao-de-frango,20110428095057\\_Y\\_581,20081118093812\\_F\\_643.aspx](http://aviculturabrasileira.org/PortalGessulli/WebSite/Noticias/eua-lideram-producao-de-frango,20110428095057_Y_581,20081118093812_F_643.aspx)> Acesso em: 16/08/2011.
- AWAD, WA; GHAREEB, K; ABDEL-RAHEEM, S et al. Effects of dietary inclusion of probiótico and symbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v.88, p. 49-55, 2009.
- BACKHED, F; DING, H; WANG, T et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.44, p. 15718-15723, 2004.
- BAGARELLI, LB; OLIANI, AH. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização *in situ* em lesões intra-epiteliais do colo uterino. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.26, n.1, p. 59-64, 2004.
- BAJZER, M; SEELEY, R. Obesity and gut flora. **Nature**, v.444, p. 1009-1010, 2006.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p. 29-32, 2005.
- BANKOVA, V; BOUDOUROVA-KRASTEVA, G; POPOV, S et al. Seasonal variations of the chemical composition of Brazilian propolis. **Apidologie**, v.29, p. 361-367, 1998.
- BANKOVA, V; CASTRO, SL; MARCUCCI, MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.



- BANKOVA, V; DYULGEROV, A; POPOV, S. Propolis produced in Bulgaria and Mongolia: phenolic compounds and plant origin. **Apidologie**, v.23, n.1, p. 79-85, 1992.
- BANSKOTA, AH; TEZUKA, Y; KADOTA, S. Recent progress in pharmacological research of propolis. **Phytotherapy Research**, v.15, n.7, p. 561-571, 2001.
- BARBOSA, AA; MÜLLER, ES; MORAES, GHK et al. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p. 308-312, 2010.
- BARTH, OM; DUTRA, VML; JUSTO, RL. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil Meridional. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p. 663-667, 1999.
- BENITEZ, JM; BARROS, RT; CEVALLOS, CVG et al. Comparação da secreção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) entre pacientes com nefropatia da IgA e deficiência de IgA. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, v.27, n.3, p. 82-93, 2004.
- BONATO, MA; SAKOMURA, NK; PIVA, GH et al. Efeito de acidificantes e extratos vegetais sobre o desempenho e qualidade de ovos de poedeiras comerciais. **Ars Veterinária**, v.24, n.3, p. 186-192, 2008.
- Brasil Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº3 – Anexo VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.
- BRUMANO, G; GATTÁS, G. Implicações sobre o uso de antimicrobianos em rações de monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.6, n.3, p. 953-959, 2009.
- BURIOL, L; FINGER, D; SCHMIDT, EM et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v.32, n.2, p. 296-302, 2009.
- BURKHOLDER, KM; THOMPSON, KL; EINSTEIN, ME et al. Influence of stressors on normal intestinal microbiota, intestinal morphology, and susceptibility to *Salmonella enteritidis* colonization in broilers. **Poultry Science**, v.87, p. 1734-1741, 2008.
- BYWATER, RJ; CASEWELL, MW. An assessment of the impact of antibiotic resistance in different bacterial species and of the contribution of animal sources to resistance in human infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.46, p.639-645, 2000.
- CABRAL, ISR; OLDONI, TLC; PRADO, A et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1523-1527, 2009.
- CASTANON, JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v.86, p. 2466-2471, 2007.
- ÇETIN, E; SILICI, S; ÇETIN, N et al. Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. **Poultry Science**, v.89, p. 1703-1708, 2010.
- CHANG, R; PILÓ-VELOSO, D; MORAIS, SAL et al. Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCi-MS and GC-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p. 549-556, 2008.
- CORRÊA, GSS; GOMES, AVC; CORRÊA, AB et al. Efeito de antibiótico e probióticos sobre o desempenho e rendimento de carcaça de frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.4, p. 467-473, 2003.

- CORRIER, DE; HINTON Jr, A; ZIPRIN, RL et al. Effect of dietary lactose on cecal pH, bacteriostatic volatile fatty acids, and *Salmonella typhimurium* colonization of broiler chicks. **Avian Disease**, v.34, p. 617-625, 1990.
- COSTA, LB; BERENCHTEIN, B; ALMEIDA, VV et al. Aditivos fitogênicos e butirato de sódio como promotores de crescimento de leitões desmamados. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p. 1-12, 2011.
- DeLONG, EF; TAYLOR, LT; MARSH, TL et al. Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent in situ hybridization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 12, p. 5554-5563, 1999.
- DENLI, M; CANKAYA, S; SILICI, S et al. Effect of dietary addition of Turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Animal Science**, v.18, n.6, p. 848-854, 2005.
- DIBNER, JJ; RICHARDS, JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v.84, p. 634-643, 2005.
- DIMOV, V; IVANOVSKA, N; MANOLOVA, N et al. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v.22, p. 155-162, 1991.
- FARIA-FILHO, DE; TORRES, KAA; FARIA, DE et al. Probiotics for broiler chickens in Brazil: systematic review and meta-analysis. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.8, n.2, p. 89-98, 2006.
- FERNANDES, AAH; ALVES, MJQF; BOTEON, EM. Avaliação do colesterol plasmático em coelhos submetidos a hipercolesterolemia induzida e tratados com extrato etanólico de própolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.4, n.2, p. 1-5, 2002.
- FERNANDES JÚNIOR, A; LOPES, MMR; COLOMBARI, V et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p. 294-297, 2006.
- FISCHER, G; HÜBNER, SO; VARGAS, GD et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.2, p. 247-253, 2008.
- FISCHER, G; PAULINO, N; MARCUCCI, MC et al. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.7, p. 908-913, 2010.
- FRANCO, SS; ROSA, AP; LENGLER, S et al. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p. 1765-1771, 2007.
- FRANKS, AH; HARMSSEN, HJM; RAANGS, GC et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n.9, p. 3336-3345, 1998.
- FREITAS, JA; VANAT, N; PINHEIRO, JW et al. The effects of propolis on antibody production by laying hens. **Poultry Science**, v.90, p. 1227-1233, 2011.
- FUKAYAMA, EH; BERTECHINI, AG; GERALDO, A et al. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p. 2316-2326, 2005.

- FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.
- FUNARI, CS; FERRO, VO. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p. 171-178,2006.
- GABRIEL, I; LESSIRE, M; MALLET, S et al. Microflora of the digestive tract: Critical factors and consequences for poultry. **World's Poultry Science Journal**, v.62, p. 499-451, 2006.
- GARCIA, RG; ARIKI, J; MORAES, VMB et al. Ação isolada ou combinada de ácidos orgânicos e promotor de crescimento em rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.2, n.2, p. 149-154, 2000.
- GARCIA, RC; SÁ, MEP; LANGONI, H et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.26, n.1, p. 57-67, 2004.
- GARCÍA-RUIZ, A; BARTOLOMÉ, B; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, AJ et al. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. **Food Control**, v.19, p. 835-841, 2008.
- GIBSON, GR; ROBERFROID, MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v.125, p. 1401-1412, 1995.
- GONG, J; SI, W; FORSTER, RJ et al. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **Federation of European Microbiological Societies**, v.59, p. 147-157, 2007.
- GONZÁLEZ, R; CORCHO, I; REMIREZ, D et al. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytotherapy Research*, v.9, p.114-117, 1995.
- HAESE, D; SILVA, BAN et al. Antibióticos comom promotores de crescimento em monogástricos. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, n.1, p.7-19, 2004.
- HAGHIGHI, HR; GONG, J; GYLES, CL et al. Modulation of antibody-mediated immune response by probióticos in chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.2, p. 1387-1392, 2005.
- HALFEN, DC; VIDOR, T; BRAGA, FM et al. Imunogenicidade do herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5) em vacinas inativadas de diferentes formulações. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p. 851-856, 2000.
- HAN, SM; LEE, KG; YEO, JH et al. Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p. 2396-2400, 2010.
- HANHINEVA, K; TÖRRÖNEN, R; BONDIA-PONS, I et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p. 1365-1402, 2010.
- HAVSTEEN, B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v.96, p. 67-202, 2002.
- INOUE, TH; SOUZA, EA; ORSI, RO et al. Produção de própolis por diferente métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**, v.15, n.2, p. 65-69, 2007.
- ISOLAURI, E; SÜTAS, Y; KANKAANPÄÄ, P et al. Probiotics: effects on immunity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.73, p. 444S-450S, 2001.

- KANASHIRO, AMI; BOTTINO, JÁ; FERREIRA, F et al. Influência da administração contínua de probiótico a frangos de corte sobre atividades enzimáticas séricas e concentração de colesterol sérico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p. 11-17, 2001.
- KONG, XF; HU, YL; YIN, YL et al. Chinese herbal ingredients are effective immune stimulators for chickens infected with the Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v.85, p. 2169-2175, 2006.
- LAPARRA, JM; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v.61, p. 219-225, 2010.
- LI, SP; ZHAO, XJ; WANG, JY. Sinergy of *Astragalus* polysaccharides and probióticos (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v.88, p. 519-525, 2009.
- LOFTY, M. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, p. 22-31, 2006.
- LU, J; IDRIS, U; HARMON, B et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and environmental microbiology**, v.69, n.11, p. 6816-6824, 2003.
- LUMPKINS, BS; BATAL, AB; LEE, M. The effect of gender on the bacterial community in the gastrointestinal tract of broilers. **Poultry Science**, v.87, p. 964-967, 2008.
- LUSTOSA, SR; GALINDO, AB; NUNES, LCC et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 447-454, 2008.
- MAHDAVI, AH; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Effect of probiotic supplements on egg quality and laying hen's performance. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.7, p. 488-492, 2005.
- MANI, F; DAMASCENO, HCR; NOVELLI, ELB et al. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, n.1-2, p. 95-98, 2006.
- MARCUCCI, MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p. 529-536, 1996.
- MARTINEZ, MAR; FRANCISCO, G; CABRAL, LS et al. Molecular genetics of non-melanoma skin cancer. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.81, n.5, p. 405-419, 2006.
- MATSUI, T; EBUCHI, S; FUJISE, T et al. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p. 1797-1803, 2004.
- McDOUGALL, GJ; KULKARNI, NN; STEWART, D. Berry polyphenols inhibit pancreatic lipase activity in vitro. **Food Chemistry**, v.115, p. 193-199, 2009.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p. 405-411, 2005.
- MESQUITA, FF; RUEDA, BZ; TARDIVO, AC et al. Efeitos da fração flavonoídica da própolis sobre o metabolismo de colesterol, em coelhos com hipercolesterolemia experimental. **Revista Brasileiras de Plantas Mediciniais**, v.9, n.1, p. 44-50, 2007.
- MILES, RD; BUTCHER, GD; HENRY, PR et al. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. **Poultry Science**, v.85, p. 476-485, 2006.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Departamento de Fomento e Fiscalização da Produção Animal/ Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo/ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Site: [www.anvisa.org](http://www.anvisa.org) DFPA/SARC/MAPA, 2008.
- NIEWOLD, TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. **Poultry Science**, v.86, p. 605-609, 2007.
- NOMURA, M; TAKAHASHI, T; NAGATA, N et al. Inhibitory mechanisms of flavonoids on insulin-stimulated glucose uptake in MC3T3-G2/PA6 adipose cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, n.7, p. 1403-1409, 2008.
- OLIVEIRA, TT; NAGEM, TJ; PINTO, AS et al. Efeito de antocianina e própolis em diabetes induzidas em coelhos. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.35, p. 464-469, 2002.
- OLIVEIRA, TT; NAGEM, TJ; RIBEIRO, JN. Análise sérica das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamiltranspeptidase de coelhos adultos tratados com extrato bruto de própolis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.26, n.1, p. 25-28, 2005.
- OLIVEIRA, MC; RODRIGUES, EA; MARQUES, RH et al. Performance and morphology of intestinal mucosa of broilers fed mannan-oligosaccharides and enzymes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p. 442-448, 2008.
- ORSI, RO; FUNARI, SRC; SOARES, AMVC et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, n.2, p. 205-219, 2000.
- ORSI, RO; SFORCIN, JM; FUNARI, SR et al. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v.5, n.2, p. 359-368, 2005.
- PANG, Y; PETTERSON, JA; APPLGATE, TJ. The influence of copper concentration and source on ileal microbiota. **Poultry Science**, v.88, p. 586-592, 2009.
- PARK, YK; IKEGAKI, M; ALENCAR, SM et al. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. **Honeybee Science**, v.21, n.2, p. 85-90, 2000.
- PEDROSO, AA; MENTEN, JFM; RACANICCI, AMC et al. Performance and organ morphology of broilers fed microbial or antimicrobial additives and raised in batteries or floor pens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.5, n.2, p. 111-117, 2003.
- PELICANO, ERL; SOUZA, PA; SOUZA, HBA et al. Performance of broilers fed diets containing natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, n.4, p. 231-236, 2004.
- PELICANO, ERL; SOUZA, PA; SOUZA, HBA et al. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.7, n. 4, p. 221-229, 2005.
- PELICANO, ERL, SOUZA, PA; SOUZA, HBA et al. Morphometry and ultra-structure of the intestinal mucosa of broilers fed different additives. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.3, p. 173-180, 2007.
- PFEIFFER, JK; SONNENBURG, JL. The intestinal microbiota and viral susceptibility. **Frontiers in Microbiology**, v.2, p. 1-6, 2011.
- PEREIRA, AS; SEIXAS, FRMS; AQUINO NETO, FR. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n.2, p. 321-326, 2002.

- PHILLIPS, I; CASEWELL, M; COX, T et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, p.28-52, 2004.
- PINTO, MS; FARIA, JE; MESSAGE, D et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.6, p. 278-283, 2001.
- RAHMANI, HR; SPEER, W. Natural additives influence the performance and humoral immunity of broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.9, p. 713-717m 2005.
- RIMM, EB; KATAN, MB; ASCHERIO, A et al. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. **Annals of Internal Medicine**, v.125, n.5, p. 384-389, 1996.
- ROCHA, AP; ABREU, RD; COSTA, MCMM et al. Prebióticos, ácidos orgânicos e probióticos em rações de frangos de corte. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.3, p 793-801, 2010.
- RIZZO, PV; MENTEN, JFM; RACANICCI, AMC et al. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.4, p. 801-807, 2010.
- SAHM, K; KNOBLAUCH, C; AMANN, R. Phylogenetic affiliation and quantification of psychrophilic sulfate-reducing isolates in marine arctic sediments. **Applied and Environmental microbiology**, v.65, n.9, p. 3976-3981, 1999.
- SALATINO, A; TEIXEIRA, EW; NEGRI, G et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p. 33-38, 2005.
- SALOMÃO, K; DANTAS, AP; BORBA, CM et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v.38, n.2, p. 87-92, 2004.
- SANTACRUZ, A; COLLADO, MC; GARCÍA-VALDÉS, L et al. Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women. **British Journal of Nutrition**, v.104, p. 83-92, 2010.
- SANTIN, E; MAIORKA, A; MACARI, M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces Cerevisiae* cell wall. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.10, p. 236-244, 2001.
- SANTOS, FA; BASTOS, EMF; MAIA, ABRA et al. Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. **Phytotherapy Research**, v.17, p. 285-289, 2003.
- SANTURIO, JM; SANTURIO, DF; POZZATTI, P et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella entérica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v.37, n. 3, p. 803-808, 2007.
- SARICA, S; CIFTCI, A; DEMIR, E et al. Use of an antibiotic growth promoter and two herbal natural feed additives with and without exogenous enzymes in wheat based broiler diets. **South African Journal of Animal Science**, v.35, n.1, p 61-72, 2005.
- SAYRAFI, R; SHAHROOZ, R; SOLTANALINEJAD, F et al. Histomorphometrical study of the prebiotic effects on intestine morphology and growth performance of broiler chickens. **Veterinary Research Forum**, v.2, n.1, p. 45-51, 2011.
- SELMA, MV, ESPÍN, JC; TOMÁS-BARBERÁN, FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 6485-6501, 2009.

- SFORCIN, JM. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 1-14, 2007.
- SFORCIN, JM; KANENO, R; FUNARI, SRC. Absence of seasonal effect on the immunomodulatory action of brazilian propolis on natural killer activity. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, n.1, p. 19-29, 2002.
- SHALMANY, SK; SHIVAZAD, M. The effect of diet propolis supplementation on ross broiler chicks performance. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p. 84-88, 2006.
- SILVA, WTM; NUNES, RV; POZZA, PC et al. Avaliação de inulina e probióticos para frangos de corte. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.33, n.1, p. 19-24, 2011.
- SILVA, MA; PESSOTTI, BMS; ZANINI, SF et al. Intestinal muosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of oregano. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p. 1471-1477, 2009.
- SOUSA, JPB; FURTADO, NAJC; JORGE, R et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 85-93, 2007.
- STRADIOTTI, D; QUEIROZ, AC; LANA, RP et al. Ação da própolis sobre a desanimação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p. 1086-1092, 2004.
- TAHERI, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Humoral immunity of broilers is affected by oil extracted própolis (OEP) in the diet. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.6, p. 414-417, 2005.
- TAKAISIKIKUNI, NB; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. **Planta Médica**, v.60, n.3, p. 222-227, 1994.
- TATEFUJI, T; IZUMI, N; OHTA, T et al. Isolation and identification of compounds from Brazilian propolis which enhance macrophage spreading and mobility. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.19, p. 966-970, 1996.
- TATLI SEVEN, PT; SEVEN, I; YILMAZ, M et al. The effects of Turkish propolis on growth and carcass characteristics in broilers under heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v.146, p. 137-148, 2008.
- TEKELI, A; KUTLU, HR; CELIK, L et al. Determination of the effects of *Z. officinale* and propolis extracts on intestinal microbiology and histological characteristics in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.9, p. 898-906, 2010.
- TOROK, VA; HUGHES, RJ; OPHEL-KELLER, K et al. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. **Poultry Science**, v.88, p. 2474-2481, 2009.
- TRUSHEVA, B; POPOVA, M; BANKOVA, V et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.3, n.2, p. 249-254. 2006.
- TURNBAUGH, PJ; LEY, RE; MAHOWALD, M.A et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v.444, p. 1027-1031, 2006.
- VARGAS, AC; LOGUERCIO, AP; WITT, NM et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p. 159-163, 2004.

- VIVEROS, A; CHAMORRO, S; PIZARRO, M et al. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. **Poultry Science**, v.90, p. 566-578, 2011.
- WALLNER, G; ERHART, R; AMANN, AR. Flow cytometric analysis of activated sludge with rRNA-targeted probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.5, p. 1859-1866, 1995.
- WANG, D; LI, X; LIXIN, X et al. Immunologic synergism with IL-2 and effects of cCHMIs on mRNA expression of IL-2 and IFN- $\gamma$  in chicken peripheral T lymphocyte. **Vaccine**, v.24, p. 7109-7114, 2006.
- WENK, C. Herbs and botanicals as feed additives in monogastric animals. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, v.16, n. 2, p. 282-289, 2003.
- WILLIAMS, RJ; SPENCER, JP; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? **Free Radical Biology and Medicine**, v.36, n.7, p. 838-849, 2004.
- WINDISCH, W; SCHEDULE, K; PLITZNER, C et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v.86, p. E140-E148, 2007.
- YOU, Q; CHEN, F; WANG, X et al. Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 9506-9511, 2011.
- ZHU, XY; JOERGERT, RD. Composition of microbiota in content and mucus from caecae of broiler chickens as measured by flouorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Poultry Science**, v.82, p. 1242-1249, 2003.
- ZIARAN, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Effect of dietary oil extract of propolis on immune response and broiler performance. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.10, p. 1485-1490, 2005.



## **II – OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da inclusão de própolis bruta e de extrato etanólico de própolis na alimentação de frangos de corte.

### **2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Verificar o efeito da inclusão de própolis bruta e de extrato etanólico de própolis nas rações, no período inicial de criação, sobre o desempenho, rendimento de carcaça, morfometria intestinal e perfil bioquímico de frangos de corte (Capítulo III e IV);

Avaliar o efeito da utilização de própolis bruta e extrato etanólico de própolis sobre a atividade das dissacaridases intestinais e enzimas pancreáticas de frangos de corte aos sete e 21 dias de idade (Capítulo III e IV);

Avaliar a capacidade da própolis bruta e do extrato etanólico de própolis como agentes imunomodulatórios em frangos de corte (Capítulo V e VI);

Determinar a comunidade microbiana cecal de frangos de corte alimentados com rações contendo própolis bruta e extrato etanólico de própolis, por meio da técnica molecular de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) (Capítulo VII e VIII).

### **III – Efeito da suplementação de extrato etanólico de própolis na dieta sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte**

**Resumo** – O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP) sobre o desempenho, parâmetros de carcaça, peso dos órgãos do trato gastrointestinal, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas intestinais e pancreáticas de frangos de corte. Foram utilizados 1020 pintos de corte, machos, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, composto por seis tratamentos, constituídos de diferentes níveis de inclusão de EEP (0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm), com cinco repetições e 34 aves por unidade experimental. As dietas experimentais foram ministradas do 1º ao 21º dia de vida das aves, sendo posteriormente, fornecida uma ração única à base de milho e farelo de soja. A suplementação de EEP no período de 1 a 7 dias afetou negativamente ( $P < 0,05$ ) o ganho de peso e consumo de ração, não influenciando ( $P > 0,05$ ) a conversão alimentar dos animais. Não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) quanto ao peso relativo da moela, intestino delgado e grosso, fígado, pâncreas e comprimento do intestino delgado aos sete e aos 21 dias de idade. No entanto, o peso relativo do proventrículo aos sete dias apresentou comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ), com o menor peso ao nível de 2865 ppm de EEP. Aos 21 dias de idade as aves que receberam suplementação do extrato nos níveis de 2943 e 3047 ppm apresentaram melhores índices ( $P < 0,05$ ) quanto a profundidade de cripta e relação vilos:cripta no duodeno, respectivamente. A altura dos vilos, profundidade de cripta e relação vilos:cripta no jejuno e íleo não foram alterados ( $P > 0,05$ ) com a suplementação de EEP. A atividade da sacarase foi diminuída linearmente no duodeno aos sete dias de idade e aumentada linearmente no jejuno aos 21 dias de idade ( $P < 0,05$ ), enquanto a atividade das enzimas pancreáticas não foi afetada pelos tratamentos ( $P > 0,05$ ). Apesar de não ter ocorrido melhorias quanto ao rendimento de carcaça e de cortes, observou-se redução ( $P < 0,05$ ) da porcentagem de gordura abdominal. Não foram observadas alterações ( $P > 0,05$ ) para colesterol total, triglicérides e para a enzima alanina aminotransferase, no entanto, a enzima aspartato aminotransferase apresentou comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ), com menor atividade ao nível de 3730 ppm de EEP. O tratamento com 1000 ppm de inclusão de EEP apresentou maior ( $P < 0,05$ ) nível enzimático quando comparado ao tratamento controle. A inclusão de 1000 a 5000 ppm de EEP na dieta pré-inicial de frangos de corte compromete o desempenho nesta fase, provavelmente pela diminuição na atividade da sacarase. No entanto, o EEP melhorou a morfometria intestinal aos 21 dias de idade e não afetou o desempenho e rendimento de carcaça aos 42 dias de idade.

**Palavras-chave:** aditivo natural, atividade antibacteriana, dissacaridases, enzimas pancreáticas

### **III – Effect of dietary supplementation with an ethanolic extract of propolis on performance, intestinal morphometry, biochemical profile and digestive enzyme activity of broiler chickens**

**Abstract** – The present study aimed to evaluate the effect of different levels of an ethanolic extract of propolis (EEP) on performance, carcass parameters, weight of gastrointestinal organs, intestinal morphometry, biochemical profile and intestinal and pancreatic enzyme activity of broiler chickens. 1,020 male broiler chicks were assigned in a completely randomized experimental design to six treatments (EEP supplement levels of 0, 1000, 2000, 3000, 4000, and 5000 ppm) and five replications, with 34 birds per experimental unit. The experimental diets were administered from 1 to 21 days of age, and the birds were subsequently provided a ration based on corn and soybean meal. EEP supplementation from 1 to 7 days negatively affected ( $P < 0.05$ ) the weight gain and feed intake but did not interfere ( $P > 0.05$ ) in feed conversion. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in the relative weight of gizzard, small and large intestine, liver, pancreas and small intestine length at the 7<sup>th</sup> and the 21<sup>nd</sup> days. The relative proventriculus weight at seven days exhibited a quadratic response ( $P < 0.05$ ), which predicted a lower weight at a dose of 2865 ppm of the EEP. For the duodenum at 21 days of age, the response pattern ( $P < 0.05$ ) predicted that birds that were fed 2943 and 3047 ppm of the EEP would exhibit an improved crypt depth and villus-to-crypt ratio, respectively. The villus height, crypt depth, and villus-to-crypt ratio in the jejunum and the ileum were not affected ( $P > 0.05$ ). With increased EEP doses, the duodenal sucrase activity linearly decreased at seven days of age and linearly increased in the jejunum at 21 days of age ( $P < 0.05$ ), while pancreatic enzyme activity was unaffected ( $P > 0.05$ ). Although the carcass and cut yields did not improve, the percentage of abdominal fat decreased ( $P < 0.05$ ). No changes were observed ( $P > 0.05$ ) for total cholesterol, triglyceride and alanine aminotransferase enzyme, however, the aspartate aminotransferase enzyme showed a quadratic behavior ( $P < 0.05$ ), with lower activity at the level of 3735 ppm of EEP. The treatment with 1000 ppm inclusion of EEP had higher ( $P < 0.05$ ) level when compared to control. The supplementation of the broiler pre-starter diet with 1000-5000 ppm of the EEP impaired performance at this stage, most likely due to the decreased in the sucrase activity. However, the EEP improved intestinal morphometry at 21 days of age and did not affect the performance or carcass yield at 42 days of age.

**Key words:** antibacterial activity, disaccharidases, natural additive, pancreatic enzymes

### **Introdução**

A cadeia produtiva avícola usufruiu, por décadas, dos benefícios da utilização de antibióticos em doses subterapêuticas sobre os índices zootécnicos. No entanto, a possibilidade de resistência microbiana, aliada à exigência de alguns mercados consumidores por produtos saudáveis que não ofereçam riscos à saúde, levam a busca por aditivos alternativos que possam substituir os antibióticos.

Neste contexto, produtos naturais dentre eles a própolis, substância resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas através da combinação de substratos retirados de exsudatos vegetais, cera, pólen e secreções salivares (Barth et al., 1999; Salantino et al., 2005), vem se destacando como provável substituta pelas propriedades terapêuticas e biológicas, como a atividade antibacteriana, antioxidante (Cabral et al., 2009), antiviral, anti-inflamatória (Marcucci, 1996), antifúngica (Longhini et al., 2007), imunoestimulante (Taheri et al., 2005), entre outras.

Sua ação farmacológica é atribuída aos mais de 300 compostos, que incluem ácidos fenólicos, flavonoides, ésteres, aldeídos aromáticos, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas e minerais (Bankova et al., 2000; Menezes, 2005; Lotfy, 2006). O grupo dos flavonoides é o mais estudado sendo capaz de interferir em diversos processos fisiológicos, como no metabolismo dos carboidratos, com propriedade anti-hiperglicêmica em ratos (Matsui et al., 2004). De fato, essas substâncias podem melhorar a saúde intestinal, aumentando a capacidade digestiva e absorptiva, com consequente influência sobre o desempenho dos animais (Denli et al., 2005).

Estes compostos podem ser extraídos da parte solúvel da própolis com o uso de solventes, processo que pode variar de semanas a meses. O solvente comumente utilizado é o álcool de cereais obtendo o produto denominado extrato etanólico de própolis (Cunha et al., 2004; Buriol et al., 2009).

Apesar das diversas propriedades fármaco-terapêuticas comprovadas, existe uma escassez de estudo sobre os efeitos destes compostos na saúde animal, para que a utilização destes produtos naturais ocorra de maneira racional. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes níveis de extrato etanólico de própolis sobre o desempenho, parâmetros de carcaça, peso dos órgãos do trato gastrointestinal, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas intestinais e pancreáticas de frangos de corte.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em um galpão convencional de 30 metros de comprimento e 8 metros de largura, dividido em boxes de 3,85m<sup>2</sup>, com cobertura de telha fibrocimento, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 metros de altura. O material utilizado como cama foi palha de arroz de primeiro uso.

Foram utilizadas 1020 aves de corte de um dia de idade, machos, linhagem Cobb-Vantress, distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, composto por seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão do extrato etanólico de própolis (EEP) (0; 1000; 2000; 3000; 4000 e 5000 ppm) nas rações, com cinco repetições e 34 aves por unidade experimental. O tratamento controle (0 ppm) não continha qualquer tipo de aditivo. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 048/2010).

O EEP, composto por 50% de própolis e 50% de álcool etílico, foi adquirido em Maringá-PR e conservado em temperatura entre 2-8°C até o momento de utilização. A composição do extrato foi determinada de acordo com Singleton & Rossi (1965) e Pierpoint (2004) para polifenóis totais e utilizando o método colorimétrico cloreto de alumínio para o conteúdo de flavonoides totais.

As dietas experimentais foram ministradas do 1° ao 21° dia de vida das aves, sendo posteriormente, fornecida a todas as unidades uma ração única à base de milho e farelo de soja. As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005) para as fases de um a sete, oito a 21 e 22 a 42 dias de idade (Tabela 1).

As aves e as sobras de rações foram pesadas semanalmente, sendo posteriormente, calculados os valores de conversão alimentar, consumo de ração e ganho de peso dos animais para cada repetição. As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas, diariamente, dentro do galpão, foram, respectivamente, de 22°C e 29°C e a umidade relativa média de 56%. O percentual de mortalidade total ficou abaixo dos 3%, sendo considerado, índice normal, não sendo atribuído aos tratamentos aplicados.

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Fases (dias)		
	1 a 7	8 a 21	22 a 42
Milho	55,75	58,63	64,45
Farelo de Soja, 45%	37,04	34,39	28,68
Óleo de Soja	2,20	2,51	3,15
Calcário	0,92	0,88	0,82
Fosfato Bicálcico	1,94	1,80	1,58
Sal	0,40	0,40	0,40
Inerte*	0,50	0,50	-
DL- Metionina, 98%	0,36	0,24	0,23
L- Lisina HCl, 78%	0,35	0,19	0,23
L- Treonina, 98%	0,15	0,05	0,06
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100
Valores calculados			
PB (%)	22,04	20,79	18,72
EMA (kcal/kg)	2,950	3,000	3,125
Cálcio (%)	0,939	0,884	0,793
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442	0,395
Met + Cis, dig (%)	0,944	0,814	0,752
Lisina, dig (%)	1,330	1,146	1,045
Treonina, dig (%)	0,865	0,745	0,679
Triptofano, dig (%)	0,213	0,183	0,177

<sup>1</sup>(1-21 dias de idade) Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.916.670 UI/kg; Vit. D3 583.330 UI/kg; Vit. E 8.750 UI/kg; Vit. K3 433.33 mg/kg; Vit. B1 408.33 mg/kg; Vit. B2 1.333,33 mg/kg, Vit. B12 4.166,67 mcg/kg; Niacina 8.983,33 mg/kg; Pantotenato de cálcio 3.166,67 mg/kg; Ácido Fólico 200 mg/kg; Biotina 25 mg/kg. Suplemento Mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.6 g/kg; Cobre 3.072 mg/kg; Iodo 248 mg/kg; Zinco 12.6 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 61.20 mg/kg; Cobalto 50.40 mg/kg.

<sup>1</sup>(22-42 dias de idade) Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.250.000 UI/kg; Vit. D3 450.000 UI/kg; Vit. E 7.000 UI/kg; Vit. K3 418 mg/kg; Vit. B1 300 mg/kg; Vit. B2 1000 mg/kg, Vit. B12 3000 mcg/kg; Niacina 7000 mg/kg; Pantotenato de Cálcio 2500 mg/kg; Ácido Fólico 140 mg/kg; Biotina 14 mg/kg. Suplemento mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.5 g/kg; Cobre 3000 mg/kg; Iodo 250 mg/kg; Zinco 12.5 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 75 mg/kg; Cobalto 50 mg/kg.

\*O extrato etanólico de própolis foi adicionado as rações em substituição ao inerte.

Aos sete e aos 21 dias de idade, cinco aves de cada tratamento, com peso representativo (média±5%), foram abatidas por insensibilização elétrica seguida de deslocamento cervical, para determinação do peso relativo (% do peso vivo) dos órgãos do trato gastrointestinal (proventrículo, moela, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e fígado), comprimento do intestino delgado e colheita de fragmentos (duodeno, jejuno e íleo) para análise da morfometria intestinal por microscopia de luz e análise da atividade de enzimas digestivas e pancreáticas. Para a amostragem dos segmentos, considerou-se o duodeno a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal, jejuno, desde a porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel e íleo, porção cranial aos cecos.

Para as análises morfométricas fragmentos de dois cm de cada segmento foram abertos longitudinalmente, lavados com solução salina, fixados em solução de formalina tamponada (10%) e em seguida desidratados em uma série de concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Luna, 1968). Após a microtomia semisseriada (cortes de sete  $\mu\text{m}$ ), os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina.

As análises morfométricas (30 leituras/amostra) foram realizadas utilizando o sistema de imagens Motic Image Plus 2.0. As alturas das vilosidades foram tomadas a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas até o ápice, e as criptas, da base até a região de transição cripta:vilo.

Os segmentos, livres de resíduos alimentares, destinados à determinação da atividade das enzimas digestivas, foram congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Para determinar a atividade das dissacaridases intestinais (sacarase e maltase) pelo método proposto por Dahlquist (1964), cada segmento foi aberto longitudinalmente e a mucosa raspada e homogeneizada após a adição de quatro partes de água destilada. Alíquotas do homogeneizado foram incubadas com substratos apropriados (sacarose ou maltose) em solução tampão malato pH 6,4. A glicose liberada durante a reação foi determinada pelo método de glicose-oxidase, utilizando kit comercial (*Gold Analisa Diagnóstica*).

A atividade das enzimas pancreáticas foi determinada após o pâncreas ser homogeneizado (1:20 peso/volume) em solução tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 50 mM  $\text{CaCl}_2$ . A atividade da tripsina foi determinada pela hidrólise de p-nitroaniline benzoyl-DL-argininine (BAPNA) em pH 8,2 após a ativação do tripsinogênio (Kakade et al. (1974). A reação foi interrompida com solução de ácido acético 3%. Método similar foi utilizado para determinação da quimiotripsina (Erlanger et al., 1966), substituindo o substrato BAPNA por N-glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide (GAPNA). A amilase foi determinada por método iodométrico utilizando kit comercial (*Gold Analisa Diagnóstica*). A atividade da lipase foi determinada pelo método BALB-DNTP utilizando kit comercial (*Gold Analisa Diagnóstica*). Os resultados referentes à atividade das enzimas intestinais e pancreáticas foram expressos por mg de proteína do tecido, a qual foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Aos 21 dias de idade, foram colhidas amostras de sangue por punção da veia jugular de cinco aves por tratamento. Parte da alíquota foi adicionada anticoagulante (EDTA) para obtenção do plasma sanguíneo e destinado às análises de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). O restante foi dessorado e o soro reservado para mensuração de colesterol total e triglicérides. As análises foram realizadas utilizando kits comerciais (*Gold Analisa Diagnóstica*).

Ao final do período experimental (42 dias de idade), dez aves representando a média de peso do tratamento ( $\pm 5\%$ ) foram submetidas a jejum alimentar de oito horas e abatidas para determinação das características de carcaça. Após a insensibilização por choque elétrico, as aves foram sacrificadas, sangradas, depenadas e evisceradas. Para o rendimento de carcaça utilizou-se o peso da carcaça eviscerada (sem cabeça, pés, pescoço e gordura abdominal) em relação ao peso da ave viva antes do abate e para o rendimento de cortes (peito, asa e perna) foi considerado o peso da carcaça eviscerada. Considerando como gordura abdominal aquela depositada próxima à bolsa cloacal e moela.

Como procedimento estatístico, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial por intermédio do programa SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 1997). Para comparação de resultados entre o tratamento controle com cada um dos níveis de inclusão de EEP foi utilizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1A_i + b_2A_i^2 + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  = valor observado das variáveis estudadas relativo a cada unidade experimental  $j$  submetida à ração com nível  $i$  de extrato etanólico de própolis,  $i = 0; 1000; 2000; 3000; 4000; 5000$  ppm;

$b_0$  = constante;

$b_1, b_2$  = são, respectivamente, coeficientes linear e quadrático de regressão da variável dependente em função dos níveis de extrato etanólico de própolis;

$e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ij}$ .



### Resultados e Discussões

A concentração de polifenóis e flavonoides totais encontrada no EEP foi de 357,71 mg/L e 112,72 mg/L, respectivamente. Valores estes superiores aos normalmente encontrados nos extratos (Silva et al., 2006; Sousa et al., 2007; Buriol et al., 2009). O grupo dos flavonoides é considerado papel chave nas atividades biológicas por causa da alta concentração (Fu et al., 2005), sendo que a presença deste composto é utilizada como parâmetro de qualidade dos produtos. Quando se faz a extração dos compostos, fatores como o tamanho da superfície de contato em relação à própolis *in natura*, o tipo do solvente e o período de extração podem influenciar nos resultados finais de concentração das substâncias com propriedades terapêuticas (Sousa et al., 2007).

A suplementação dietética de EEP proporcionou um efeito linear negativo ( $P < 0,05$ ) sobre o ganho de peso e consumo médio de ração no período de um a sete dias, não influenciando a conversão alimentar ( $P > 0,05$ ) dos animais (Tabela 2). Os altos níveis de inclusão do EEP aliado a maior concentração do extrato do que normalmente é utilizado (50% de própolis e 50% de álcool etílico) podem ter interferido nos resultados, mesmo considerando que a absorção intestinal dos polifenóis é baixa (Alves et al., 2008) e estudos de toxicidade em ratos demonstrarem que a tolerância aos compostos é relativamente alta (Burdock, 1998; Mohammadzadeh et al., 2007).

Pelo teste de Dunnett, apenas o tratamento com nível de inclusão de 5000 ppm de EEP apresentou menor ( $P < 0,05$ ) consumo de ração aos sete dias quando comparado ao tratamento controle (0 ppm) (Tabela 2). Embora a própolis possua substâncias como resinas, ceras e mel que são palatáveis (Tatli Seven, 2008b; Shalmany & Shivazad, 2006) os altos níveis de EEP podem ter ocasionado perda na palatabilidade. Apesar da influência negativa encontrada na fase pré-inicial, para os demais períodos de criação não foi observado diferença ( $P > 0,05$ ) para todas as variáveis de desempenho (Tabela 2).

Desta forma, de acordo com os resultados de desempenho, a adição de EEP na ração não teve efeitos negativos aos 21 dias e no período total de criação. Isto indica que a inclusão de EEP, nos níveis estudados, foi prejudicial somente na primeira semana de vida, visto que os animais recuperaram os parâmetros de desempenho aos 21 e 42 dias de idade.

Tabela 2 - Desempenho ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Ganho de Peso, g	Consumo de Ração, g	Conversão Alimentar
1 a 7 dias			
Controle	134,28 $\pm$ 2,20	164,35 $\pm$ 2,84	1,224 $\pm$ 0,01
1000 ppm	136,07 $\pm$ 5,12	170,16 $\pm$ 3,64	1,254 $\pm$ 0,03
2000 ppm	130,08 $\pm$ 3,37	160,47 $\pm$ 2,34	1,235 $\pm$ 0,02
3000 ppm	132,54 $\pm$ 3,09	158,29 $\pm$ 1,89	1,196 $\pm$ 0,02
4000 ppm	126,70 $\pm$ 2,76	161,19 $\pm$ 3,34	1,274 $\pm$ 0,03
5000 ppm	126,07 $\pm$ 1,37	153,85 $\pm$ 2,30*	1,220 $\pm$ 0,01
CV (%)	5,46	3,87	3,78
Regressão	Linear <sup>1</sup>	Linear <sup>2</sup>	ns
1 a 21 dias			
Controle	792,87 $\pm$ 21,86	1183,73 $\pm$ 13,99	1,496 $\pm$ 0,02
1000 ppm	826,30 $\pm$ 21,62	1231,45 $\pm$ 17,83	1,492 $\pm$ 0,02
2000 ppm	822,13 $\pm$ 10,01	1234,16 $\pm$ 25,42	1,502 $\pm$ 0,04
3000 ppm	841,27 $\pm$ 15,70	1242,14 $\pm$ 34,49	1,476 $\pm$ 0,02
4000 ppm	809,55 $\pm$ 17,93	1221,08 $\pm$ 25,99	1,509 $\pm$ 0,02
5000 ppm	789,36 $\pm$ 7,96	1162,02 $\pm$ 5,86	1,472 $\pm$ 0,01
CV (%)	4,65	4,24	3,44
Regressão	ns	ns	ns
1 a 42 dias			
Controle	2596,80 $\pm$ 56,71	4617,63 $\pm$ 62,35	1,780 $\pm$ 0,02
1000 ppm	2701,43 $\pm$ 55,87	4782,09 $\pm$ 92,70	1,770 $\pm$ 0,01
2000 ppm	2651,15 $\pm$ 33,39	4664,83 $\pm$ 79,89	1,760 $\pm$ 0,02
3000 ppm	2678,31 $\pm$ 72,92	4801,16 $\pm$ 90,44	1,795 $\pm$ 0,02
4000 ppm	2639,62 $\pm$ 52,20	4647,34 $\pm$ 73,32	1,761 $\pm$ 0,01
5000 ppm	2591,42 $\pm$ 40,55	4696,99 $\pm$ 24,68	1,814 $\pm$ 0,03
CV (%)	4,57	3,60	2,43
Regressão	ns	ns	ns

\*Significativo pelo teste de Dunnett (P<0,05)

ns = não significativo

<sup>1</sup> Y = 137,310 - 0,00233937x (R<sup>2</sup>=0,79); (P=0,04)

<sup>2</sup> Y = 170,366 - 0,00319139x (R<sup>2</sup>= 0,71); (P=0,002)

A capacidade de melhora no desempenho pela inclusão de produtos naturais se deve a interferência em diversos processos fisiológicos, como digestão, imunidade e, principalmente, por possuírem atividade antimicrobiana (Menezes, 2005). Estes compostos são capazes de interferir na aderência das bactérias patogênicas (Jamroz et al., 2006; Windisch et al., 2008) e podem principalmente modular qualitativamente a microbiota intestinal, favorecendo o crescimento de bactérias benéficas como lactobacilos e bifidobactérias (Guo et al., 2004), melhorando seu equilíbrio. Além disso, os flavonoides possuem um grupamento hidroxil da aglicona posicionado similarmente

aos estrógenos, predizendo uma possível ação como os hormônios do crescimento (Ziaran et al., 2005).

Neste contexto, diversos trabalhos demonstram os efeitos positivos sobre o desempenho de animais alimentados com rações contendo própolis (Denli et al., 2005; Shalmany & Shivazad, 2006; Galal et al., 2008; Tatli Seven et al., 2008a; Tekeli et al., 2011). No entanto, os níveis utilizados na fase pré-inicial de criação podem ter dificultado o estabelecimento de uma microbiota benéfica, com subsequente desequilíbrio intestinal, interferindo na utilização dos nutrientes, podendo ser um dos fatores responsáveis pelos animais não expressarem resultados benéficos nas demais fases de criação.

O peso relativo da moela, intestino delgado, intestino grosso, fígado e pâncreas e o comprimento do intestino delgado dos animais aos sete e aos 21 dias de idade não foram alterados ( $P>0,05$ ) pela inclusão de EEP nas rações. No entanto, o peso relativo do proventrículo aos sete dias apresentou comportamento quadrático ( $P<0,05$ ), com menor peso relativo ao nível de 2865 ppm de EEP. Quando comparado cada nível de inclusão de EEP ao tratamento controle não foi observado diferença ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

A alteração no peso relativo do proventrículo pode estar relacionada à redução no consumo de ração, prejudicando o desenvolvimento do órgão. Alguns autores constataram efeito positivo no consumo alimentar quando ministrado rações contendo EEP, provavelmente em razão do aumento da palatabilidade das rações, porém, a concentração utilizada foi em média dez vezes menor quando comparada ao deste estudo (Shalmany & Shivazad, 2006; Galal et al., 2008).

Deve-se salientar a não constatação de alterações do peso relativo do fígado, demonstrando que não houve sobrecarga tanto do álcool utilizado como solvente quanto da própolis considerando que o órgão é responsável pela destoxificação de substâncias nocivas ao organismo (Boratto et al., 2004; Garcia et al., 2004).

Tabela 3 - Peso relativo (%) dos órgãos do trato gastrointestinal e comprimento do intestino delgado (cm) ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Proventrículo	Moela	Intestino Delgado	Comprimento Intestino Delgado	Intestino Grosso	Fígado	Pâncreas
7 dias							
Controle	1,009 $\pm$ 0,01	4,689 $\pm$ 0,19	9,625 $\pm$ 0,28	97,350 $\pm$ 1,64	1,637 $\pm$ 0,08	3,481 $\pm$ 0,11	0,534 $\pm$ 0,03
1000 ppm	1,076 $\pm$ 0,05	4,361 $\pm$ 0,14	9,817 $\pm$ 0,29	98,125 $\pm$ 0,72	1,715 $\pm$ 0,08	3,755 $\pm$ 0,19	0,538 $\pm$ 0,04
2000 ppm	0,973 $\pm$ 0,02	4,538 $\pm$ 0,19	10,180 $\pm$ 0,16	98,850 $\pm$ 1,82	1,609 $\pm$ 0,18	3,381 $\pm$ 0,13	0,498 $\pm$ 0,01
3000 ppm	0,976 $\pm$ 0,02	4,264 $\pm$ 0,19	9,759 $\pm$ 0,37	98,250 $\pm$ 2,32	1,517 $\pm$ 0,03	3,534 $\pm$ 0,22	0,506 $\pm$ 0,01
4000 ppm	1,007 $\pm$ 0,03	4,694 $\pm$ 0,27	10,189 $\pm$ 0,30	97,675 $\pm$ 1,48	1,744 $\pm$ 0,24	3,419 $\pm$ 0,16	0,525 $\pm$ 0,03
5000 ppm	1,102 $\pm$ 0,03	4,855 $\pm$ 0,21	10,171 $\pm$ 0,18	98,000 $\pm$ 1,08	1,578 $\pm$ 0,12	3,648 $\pm$ 0,14	0,481 $\pm$ 0,02
CV (%)	6,55	9,85	6,18	3,69	19,39	10,26	11,94
Regressão	Quadrática <sup>1</sup>	ns	ns	ns	ns	ns	ns
21 dias							
Controle	0,596 $\pm$ 0,01	2,460 $\pm$ 0,06	7,444 $\pm$ 0,48	156,300 $\pm$ 5,87	1,041 $\pm$ 0,04	2,543 $\pm$ 0,05	0,352 $\pm$ 0,01
1000 ppm	0,611 $\pm$ 0,04	2,487 $\pm$ 0,12	7,276 $\pm$ 0,31	158,800 $\pm$ 3,98	1,172 $\pm$ 0,12	2,658 $\pm$ 0,08	0,412 $\pm$ 0,01
2000 ppm	0,647 $\pm$ 0,02	2,293 $\pm$ 0,06	7,445 $\pm$ 0,35	168,200 $\pm$ 3,97	1,114 $\pm$ 0,09	2,753 $\pm$ 0,05	0,353 $\pm$ 0,01
3000 ppm	0,614 $\pm$ 0,04	2,424 $\pm$ 0,12	7,069 $\pm$ 0,30	157,600 $\pm$ 4,67	1,256 $\pm$ 0,10	2,649 $\pm$ 0,15	0,399 $\pm$ 0,03
4000 ppm	0,569 $\pm$ 0,03	2,413 $\pm$ 0,12	6,900 $\pm$ 0,10	161,700 $\pm$ 3,50	1,372 $\pm$ 0,08	2,610 $\pm$ 0,11	0,379 $\pm$ 0,01
5000 ppm	0,585 $\pm$ 0,02	2,553 $\pm$ 0,14	7,508 $\pm$ 0,29	156,000 $\pm$ 5,34	1,338 $\pm$ 0,15	2,839 $\pm$ 0,06	0,351 $\pm$ 0,02
CV (%)	9,86	9,87	9,95	6,48	18,89	7,67	10,68
Regressão	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett (P>0,05)

ns = não significativo

<sup>1</sup> Y = 1,21395 - 0,000172607x + 0,00000003012x<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,98); (P=0,003); Ponto de mínima: 2865 ppm

Os diferentes níveis de inclusão de EEP não alteraram ( $P>0,05$ ) os valores de altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta no jejuno e íleo dos animais aos sete e aos 21 dias de idade. No caso do segmento duodeno somente foram observadas ( $P<0,05$ ) alterações morfométricas quanto as variáveis profundidade de cripta e relação vilo:cripta aos 21 dias de idade, apresentando efeito quadrático, com menor e maior valor atingido ao nível de 2943 e 3047 ppm de EEP, respectivamente. Quando comparado cada nível de inclusão do extrato com o tratamento controle não foi observado diferença ( $P>0,05$ ) para todas as variáveis de morfometria intestinal (Tabela 4).

A menor profundidade de cripta atingida está correlacionada com a menor necessidade de renovação celular (Oliveira et al., 2008) reduzindo gasto energético e proteico para esta síntese, disponibilizando para o crescimento de outros tecidos corporais (Miles et al., 2006). Em adição, a maior relação vilo:cripta sugere uma maior capacidade digestiva e absorptiva (Silva et al., 2009). De fato, a mucosa intestinal pode ser influenciada de maneira benéfica pelos compostos presentes na própolis, em virtude do controle da proliferação de bactérias patogênicas, evitando possíveis danos à mucosa intestinal, que acarretariam em reduções nos parâmetros dimensionais dos vilos (Sayrafi et al., 2011).

É interessante ressaltar que as alterações morfológicas benéficas observadas na morfometria intestinal ocorreram juntamente com o aumento na atividade da enzima sacarase no jejuno aos 21 dias de idade (Tabela 5). Assim, a recuperação dos índices de desempenho a partir da fase pré-inicial pode ser atribuída a estas modificações.

Tabela 4 - Altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ ) e relação altura de vilo:profundidade de cripta (V:C) ( $\pm$  erro padrão) dos segmentos do intestino delgado de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP).

	Níveis de EEP						CV	Reg
	Controle	1000 ppm	2000 ppm	3000 ppm	4000 ppm	5000 ppm		
	7 dias							
	Altura de Vilo							
Duodeno	1033,99 $\pm$ 34,35	981,83 $\pm$ 58,39	1000,47 $\pm$ 36,99	929,89 $\pm$ 29,57	904,11 $\pm$ 81,64	977,15 $\pm$ 26,94	11,29	ns
Jejuno	448,15 $\pm$ 23,97	468,07 $\pm$ 30,55	452,41 $\pm$ 47,96	465,19 $\pm$ 33,52	477,77 $\pm$ 37,10	479,63 $\pm$ 36,39	16,41	ns
Íleo	366,76 $\pm$ 14,58	330,53 $\pm$ 19,80	369,67 $\pm$ 24,93	354,53 $\pm$ 17,72	363,40 $\pm$ 30,10	351,06 $\pm$ 4,77	12,99	ns
	Profundidade de Cripta							
Duodeno	166,43 $\pm$ 12,61	178,66 $\pm$ 13,54	182,91 $\pm$ 9,67	191,39 $\pm$ 3,41	204,66 $\pm$ 17,00	194,07 $\pm$ 7,51	14,06	ns
Jejuno	126,57 $\pm$ 3,65	130,71 $\pm$ 6,36	129,82 $\pm$ 15,56	131,69 $\pm$ 5,34	142,93 $\pm$ 3,68	118,90 $\pm$ 4,14	11,52	ns
Íleo	95,24 $\pm$ 7,43	85,19 $\pm$ 2,99	91,19 $\pm$ 4,48	101,12 $\pm$ 6,34	97,88 $\pm$ 9,73	88,52 $\pm$ 10,77	16,97	ns
	Relação altura de vilo:profundidade de cripta							
Duodeno	6,44 $\pm$ 0,76	5,69 $\pm$ 0,68	5,54 $\pm$ 0,40	4,85 $\pm$ 0,10	4,50 $\pm$ 0,42	5,06 $\pm$ 0,19	20,74	ns
Jejuno	3,54 $\pm$ 0,17	3,60 $\pm$ 0,24	3,50 $\pm$ 0,15	3,55 $\pm$ 0,26	3,35 $\pm$ 0,27	4,02 $\pm$ 0,22	14,02	ns
Íleo	3,91 $\pm$ 0,22	3,89 $\pm$ 0,22	4,07 $\pm$ 0,24	3,56 $\pm$ 0,29	3,76 $\pm$ 0,19	4,15 $\pm$ 0,53	15,99	ns
	21 dias							
	Altura de Vilo							
Duodeno	1652,58 $\pm$ 55,24	1510,36 $\pm$ 108,93	1581,30 $\pm$ 32,00	1610,86 $\pm$ 53,76	1533,33 $\pm$ 76,75	1598,09 $\pm$ 79,04	10,31	ns
Jejuno	880,02 $\pm$ 54,64	885,44 $\pm$ 56,88	756,38 $\pm$ 72,34	688,36 $\pm$ 86,84	823,57 $\pm$ 49,17	750,15 $\pm$ 62,45	17,79	ns
Íleo	486,72 $\pm$ 24,14	490,30 $\pm$ 20,11	549,24 $\pm$ 34,71	480,33 $\pm$ 10,54	505,71 $\pm$ 31,09	535,85 $\pm$ 29,17	11,53	ns
	Profundidade de Cripta							
Duodeno	193,40 $\pm$ 14,43	212,22 $\pm$ 10,52	180,72 $\pm$ 5,41	192,07 $\pm$ 7,68	187,34 $\pm$ 6,33	213,83 $\pm$ 7,82	10,54	Q <sup>1</sup>
Jejuno	138,17 $\pm$ 5,77	141,91 $\pm$ 7,89	121,22 $\pm$ 4,95	123,15 $\pm$ 6,07	130,26 $\pm$ 6,27	130,33 $\pm$ 6,34	10,70	ns
Íleo	106,80 $\pm$ 5,33	107,73 $\pm$ 4,86	112,71 $\pm$ 3,20	103,82 $\pm$ 3,74	104,60 $\pm$ 3,50	118,05 $\pm$ 6,48	9,57	ns
	Relação altura de vilo:profundidade de cripta							
Duodeno	8,80 $\pm$ 0,88	7,15 $\pm$ 0,50	8,77 $\pm$ 0,22	8,45 $\pm$ 0,47	8,24 $\pm$ 0,56	7,52 $\pm$ 0,49	15,58	Q <sup>2</sup>
Jejuno	6,42 $\pm$ 0,48	6,30 $\pm$ 0,47	6,19 $\pm$ 0,35	5,57 $\pm$ 0,60	6,40 $\pm$ 0,53	5,89 $\pm$ 0,72	19,74	ns
Íleo	4,57 $\pm$ 0,12	4,60 $\pm$ 0,32	4,89 $\pm$ 0,34	4,66 $\pm$ 0,23	4,87 $\pm$ 0,37	4,61 $\pm$ 0,41	14,88	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett (P>0,05); ns = não significativo

<sup>1</sup> Y = 244,232 - 0,0412346x + 0,00000700631x<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,81); (P=0,003); Ponto de mínima: 2943 ppm

<sup>2</sup> Y = 5,676 + 0,00194855x - 0,000000319772x<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,84); (P=0,02); Ponto de máxima: 3047 ppm

A suplementação dietética de EEP proporcionou um efeito linear decrescente ( $P < 0,05$ ) para a atividade da sacarase no duodeno aos sete dias de idade. Quando comparado cada nível de inclusão do extrato com o tratamento controle, observou-se maior atividade da enzima ( $P < 0,05$ ) ao nível de 3000 ppm. Embora não tenha apresentado significância nos testes de regressão ( $P > 0,05$ ), a atividade da sacarase no jejuno foi maior nos animais alimentados com 5000 ppm de EEP em relação ao tratamento controle ( $P < 0,05$ ) aos sete dias de idade. Aos 21 dias, a atividade da sacarase no jejuno aumentou linearmente de acordo com o aumento dos níveis de EEP ( $P < 0,05$ ), com menor valor atingido ao nível de 1000 ppm de extrato em relação ao tratamento controle ( $P < 0,05$ ). Para o segmento íleo, nas diferentes idades estudadas, e para o duodeno aos 21 dias a atividade da sacarase não foi alterada ( $P > 0,05$ ) pela inclusão de EEP nas rações (Tabela 5).

Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) para a atividade da maltase nos diferentes segmentos aos sete e 21 dias. No entanto, o nível de inclusão de 4000 ppm de EEP apresentou maior atividade da enzima ( $P < 0,05$ ) no jejuno quando comparado ao tratamento sem inclusão do extrato aos 21 dias de idade (Tabela 5).

As alterações ocasionadas na atividade da enzima sacarase com redução no duodeno aos sete dias podem estar relacionadas à redução no ganho de peso dos animais nesta idade. Vários autores mostram que o EEP possui efeito anti-hiperglicêmico em ratos (Skopec et al., 2010). A própolis atua como inibidora das  $\alpha$ -glicosidases no intestino delgado promovendo redução na digestão de carboidratos a monossacarídeos absorvíveis e, conseqüentemente decréscimo ou retardo na absorção destes (Matsui et al., 2004). Estes autores sugerem ainda que a família de compostos do ácido cafeoilquínico, constituinte da própolis, pode ser a responsável por este efeito.

Além disso, grande quantidade de compostos fenólicos, presentes na própolis, afeta o metabolismo da glicose, através da inibição da absorção no intestino, estimulação da secreção de insulina entre outros mecanismos (Hanhineva et al., 2010). De fato, alguns autores têm mostrado que os flavonoides reduzem a captação de glicose no enterócito, através da diminuição da atividade do transportador SGLT1 e GLUT2 (Johnston et al., 2002; Kwon et al., 2007).

Tabela 5 – Atividade das dissacaridases intestinais (U/mg de proteína) ( $\pm$  erro padrão) nos diferentes segmentos do intestino delgado ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Sacarase Duodeno	Sacarase Jejuno	Sacarase Íleo	Maltase Duodeno	Maltase Jejuno	Maltase Íleo
7 dias						
Controle	12,03 $\pm$ 0,87	6,40 $\pm$ 0,85	7,43 $\pm$ 1,77	27,08 $\pm$ 2,73	29,39 $\pm$ 5,21	25,47 $\pm$ 4,13
1000 ppm	12,70 $\pm$ 0,99	9,10 $\pm$ 1,38	5,82 $\pm$ 2,26	26,89 $\pm$ 2,82	30,40 $\pm$ 3,84	28,00 $\pm$ 5,30
2000 ppm	13,41 $\pm$ 0,93	11,26 $\pm$ 1,05	8,48 $\pm$ 1,63	24,81 $\pm$ 1,81	34,75 $\pm$ 5,38	28,19 $\pm$ 1,81
3000 ppm	14,07 $\pm$ 0,55*	6,75 $\pm$ 0,97	4,75 $\pm$ 1,15	21,02 $\pm$ 2,18	20,94 $\pm$ 0,90	25,25 $\pm$ 4,14
4000 ppm	9,58 $\pm$ 0,55	8,88 $\pm$ 1,02	7,12 $\pm$ 1,34	27,44 $\pm$ 1,03	34,02 $\pm$ 4,62	25,18 $\pm$ 2,13
5000 ppm	11,17 $\pm$ 0,73	12,79 $\pm$ 2,35*	8,94 $\pm$ 2,84	25,95 $\pm$ 1,21	33,57 $\pm$ 3,69	30,50 $\pm$ 7,18
CV (%)	39,72	33,20	60,50	18,22	31,15	37,14
Regressão	Linear <sup>1</sup>	ns	ns	ns	ns	ns
21 dias						
Controle	4,22 $\pm$ 0,75	8,91 $\pm$ 0,93	6,93 $\pm$ 1,07	22,58 $\pm$ 2,73	27,00 $\pm$ 2,11	24,48 $\pm$ 4,04
1000 ppm	4,53 $\pm$ 1,12	5,61 $\pm$ 0,67*	7,20 $\pm$ 0,48	23,71 $\pm$ 3,51	24,44 $\pm$ 1,80	25,40 $\pm$ 3,58
2000 ppm	7,10 $\pm$ 1,51	10,36 $\pm$ 1,34	9,02 $\pm$ 0,91	26,25 $\pm$ 2,77	37,34 $\pm$ 2,05	30,55 $\pm$ 1,47
3000 ppm	9,81 $\pm$ 2,74	7,66 $\pm$ 0,22	7,05 $\pm$ 0,85	34,31 $\pm$ 7,21	25,08 $\pm$ 0,91	31,36 $\pm$ 3,23
4000 ppm	6,25 $\pm$ 2,08	9,43 $\pm$ 1,35	8,63 $\pm$ 1,46	35,03 $\pm$ 10,74	38,59 $\pm$ 6,32*	32,74 $\pm$ 3,33
5000 ppm	7,13 $\pm$ 1,03	10,36 $\pm$ 0,72	7,80 $\pm$ 1,66	24,02 $\pm$ 3,14	26,99 $\pm$ 2,58	26,76 $\pm$ 2,67
CV (%)	57,76	24,93	32,81	47,24	23,49	24,17
Regressão	ns	Linear <sup>2</sup>	ns	ns	ns	ns

\*Significativo pelo teste de Dunnett (P<0,05)

ns = não significativo

<sup>1</sup>Y= 14.2523 - 0.000689074x (R<sup>2</sup>=0.36); (P=0,035)

<sup>2</sup>Y= 6.15381 + 0.000858245x (R<sup>2</sup>=0.45); (P=0,012)



Embora a inclusão de EEP na dieta tenha alterado a atividade das dissacaridasas intestinais, nenhum efeito foi observado na atividade da lipase, amilase, tripsina e quimiotripsina ( $P>0,05$ ) independentemente do nível de inclusão aos sete e 21 dias de idade (Tabela 6).

É importante salientar que não há estudos na literatura sobre os efeitos dos polifenóis na atividade de enzimas digestivas de frangos de corte. Em mamíferos, vários artigos descrevem o efeito inibidor dos polifenóis sobre a atividade das enzimas pancreáticas. Hanhieva et al. (2010) descreveram vários estudos que mostram o efeito inibidor dos polifenóis sobre a  $\alpha$ -amilase *in vitro*. Efeito inibidor semelhante é descrito para a atividade da lipase, e este efeito pode ser favorável no metabolismo lipídico e controle de ganho de peso, sendo a antocianina considerada a substância com maior potencial (You et al., 2011). Considerando dados apresentados na literatura com relação às enzimas proteolíticas tripsina e quimiotripsina, somente a tripsina parece ser inibida pelos polifenóis da dieta (Gonçalves et al., 2007).

Tabela 6 – Atividade da lipase (UI/mg de proteína), amilase (UA/  $\mu$ g de proteína), tripsina (nmol/  $\mu$ g de proteína) e quimiotripsina (nmol/  $\mu$ g de proteína) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Lipase	Amilase	Tripsina	Quimiotripsina
7 dias				
Controle	3,82 $\pm$ 1.19	5,89 $\pm$ 0.40	25,42 $\pm$ 9.31	3,36 $\pm$ 0.77
1000 ppm	4,31 $\pm$ 1.27	7,83 $\pm$ 1.28	22,37 $\pm$ 4.51	3,34 $\pm$ 0.46
2000 ppm	7,09 $\pm$ 1.21	9,13 $\pm$ 2.52	26,95 $\pm$ 1.68	3,13 $\pm$ 0.52
3000 ppm	4,24 $\pm$ 1.67	5,43 $\pm$ 1.66	22,71 $\pm$ 5.35	3,28 $\pm$ 0.59
4000 ppm	4,90 $\pm$ 1.86	11,88 $\pm$ 5.12	27,08 $\pm$ 8.11	5,52 $\pm$ 1.44
5000 ppm	6,67 $\pm$ 2.21	6,64 $\pm$ 0.90	28,70 $\pm$ 9.87	3,58 $\pm$ 0.44
CV (%)	63.04	64.70	52.68	45.03
Regressão	ns	ns	ns	ns
21 dias				
Controle	14,31 $\pm$ 3.64	5,27 $\pm$ 1.29	12,50 $\pm$ 2.71	3,60 $\pm$ 0.24
1000 ppm	8,70 $\pm$ 4.20	6,55 $\pm$ 1.77	23,53 $\pm$ 6.63	4,43 $\pm$ 0.35
2000 ppm	11,78 $\pm$ 2.37	3,97 $\pm$ 0.78	20,74 $\pm$ 6.43	5,29 $\pm$ 0.97
3000 ppm	13,33 $\pm$ 3.40	4,52 $\pm$ 1.50	13,88 $\pm$ 2.27	4,33 $\pm$ 0.36
4000 ppm	15,25 $\pm$ 6.04	3,80 $\pm$ 0.84	19,13 $\pm$ 6.16	4,97 $\pm$ 1.22
5000 ppm	13,77 $\pm$ 3.02	4,95 $\pm$ 1.03	17,96 $\pm$ 6.48	4,21 $\pm$ 0.72
CV (%)	63.02	51.64	63.02	35.90
Regressão	ns	ns	ns	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P>0,05$ )

ns = não significativo

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) para o rendimento de carcaça e de cortes (peito, perna e asa) dos animais aos 42 dias de idade quando da inclusão até 21 dias de EEP nas rações. No entanto, os níveis de inclusão de 1000 ppm e 3000 ppm de EEP apresentaram menor porcentagem de gordura abdominal ( $P<0,05$ ) quando comparados ao tratamento sem inclusão do extrato (Tabela 7).

Tabela 7 - Rendimento de carcaça (%) e de cortes (%) ( $\pm$  erro padrão) de frangos abatidos aos 42 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Carcaça	Peito	Perna	Asa	Gordura
Controle	71,36 $\pm$ 0,47	36,12 $\pm$ 0,38	31,04 $\pm$ 0,49	11,15 $\pm$ 0,12	2,40 $\pm$ 0,09
1000 ppm	72,77 $\pm$ 0,44	37,08 $\pm$ 0,31	30,60 $\pm$ 0,12	11,03 $\pm$ 0,24	1,75 $\pm$ 0,07*
2000 ppm	71,55 $\pm$ 0,72	36,18 $\pm$ 0,33	30,72 $\pm$ 0,18	10,87 $\pm$ 0,07	2,52 $\pm$ 0,10
3000 ppm	72,53 $\pm$ 0,40	37,29 $\pm$ 0,25	30,12 $\pm$ 0,27	10,98 $\pm$ 0,17	2,01 $\pm$ 0,19*
4000 ppm	72,63 $\pm$ 0,22	37,70 $\pm$ 0,58	29,84 $\pm$ 0,49	10,97 $\pm$ 0,12	2,34 $\pm$ 0,04
5000 ppm	72,67 $\pm$ 0,87	36,75 $\pm$ 0,50	30,22 $\pm$ 0,42	11,17 $\pm$ 0,22	2,16 $\pm$ 0,10
CV (%)	1,74	2,47	2,65	3,42	11,35
Regressão	ns	ns	ns	ns	ns

\*Significativo pelo teste de Dunnett ( $P<0,05$ )  
ns = não significativo

Resultados positivos sobre as características de carcaça podem ser difíceis de serem encontrados, independentemente de alterações sobre os parâmetros de desempenho (Franco et al., 2007). Pode ter ocorrido a junção de fatores, como a redução do desempenho na primeira semana de vida das aves, aliado ao fato da suplementação de EEP ter sido realizada somente nos primeiros 21 dias, que pode ser insuficiente para acarretar melhorias na carcaça.

Quanto à redução da porcentagem de gordura abdominal, pode ser pela ação lipolítica atribuída aos componentes da própolis. Segundo o mecanismo de ação sugerido, estes compostos são capazes de inibir a enzima fosfodiesterase, responsável pela degradação do AMP cíclico, aumentando seus níveis intracelulares, com consequente aumento na lipólise, ou seja, a degradação de lipídios em ácidos graxos e glicerol (Jin et al., 1998; Loddi et al., 2000; Braga & Alves, 2000; Oliveira et al., 2010). Desta forma, enquanto os animais recebiam as dietas contendo EEP pode ter ocorrido menor deposição de gordura, refletindo em melhores resultados no abate.

Os níveis de colesterol total e triglicérides e a atividade enzimática da alanina aminotransferase (ALT) dos animais aos 21 dias de idade não foram influenciados

( $P > 0,05$ ) pela suplementação de EEP nas rações. Já a enzima aspartato aminotransferase (AST) apresentou comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ), com menor atividade ao nível de inclusão de 3735 ppm de EEP. Além disso, houve maior atividade enzimática AST ( $P < 0,05$ ) no tratamento com 1000 ppm de EEP quando comparada ao grupo controle (Tabela 8).

Tabela 8 - Colesterol total (mg dL<sup>-1</sup>), triglicérides (mg dL<sup>-1</sup>), alanina aminotransferase (ALT) (U/I) e aspartato aminotransferase (AST) (U/I) ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Colesterol Total	Triglicérides	ALT	AST
Controle	126,52 $\pm$ 6,50	123,28 $\pm$ 11,41	3,14 $\pm$ 0,35	123,62 $\pm$ 9,03
1000 ppm	118,64 $\pm$ 4,18	111,53 $\pm$ 0,56	4,19 $\pm$ 0,43	190,32 $\pm$ 19,61*
2000 ppm	113,78 $\pm$ 1,95	100,08 $\pm$ 8,89	4,02 $\pm$ 0,32	133,05 $\pm$ 9,23
3000 ppm	125,72 $\pm$ 8,82	103,65 $\pm$ 12,00	3,93 $\pm$ 0,34	141,77 $\pm$ 10,83
4000 ppm	103,88 $\pm$ 1,79	129,72 $\pm$ 9,90	4,58 $\pm$ 0,65	141,42 $\pm$ 7,56
5000 ppm	119,20 $\pm$ 5,27	102,33 $\pm$ 8,38	3,49 $\pm$ 0,55	136,19 $\pm$ 4,08
CV (%)	10,32	21,38	25,09	17,31
Regressão	ns	ns	ns	Quadrática <sup>1</sup>

\* Significativo pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ )

ns = não significativo

<sup>1</sup>  $Y = 227,268 - 0,051805x + 0,00000693467x^2$ ; ( $R^2 = 0,74$ ); ( $P = 0,04$ ); Ponto de mínima: 3735 ppm

O fato da própolis ser considerada um agente antiaterogênico, capaz de reduzir o colesterol total e a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e aumentar a lipoproteína de alta densidade (HDL) (Mesquita et al., 2007) deve-se ao seu poder antioxidante.

Os compostos biologicamente ativos da própolis podem inibir a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados que entram na constituição da molécula de colesterol fazendo com que seja reconhecida pelas células alvo (Rimm et al., 1996; Mesquita et al., 2007). Além disso, as bactérias do trato gastrointestinal dos animais são capazes de hidrolisar os sais biliares conjugados no intestino, eliminando-os, sendo necessário mais colesterol hepático para a nova síntese (Kanashiro et al., 2001). Já os níveis de triglicérides podem ser alterados, pelo aumento na atividade da lipase lipoproteica, enzima responsável pela hidrólise dos triglicérides (Oliveira et al., 2002).

Apesar dos possíveis mecanismos de ação reportados, resultado semelhante foi relatado por Mani et al. (2006), em que mesmo em longos períodos de administração de EEP em ratos, por 150 dias, não houve mudança no perfil bioquímico dos animais.

A determinação das enzimas AST e ALT é utilizada para detectar possíveis ações tóxicas da administração de aditivos. A avaliação de suas atividades pode indicar o *status* metabólico do fígado (Barbosa et al., 2010). O aumento na concentração plasmática dessas enzimas seria um indicador de possíveis danos aos tecidos (Garcia et al., 2004; Tatli Seven et al., 2009).

O incremento na atividade plasmática de AST no tratamento com 1000 ppm de inclusão indicaria injúrias hepáticas, no entanto, se este aumento fosse por causa do efeito tóxico do EEP sobre o organismo animal, os níveis mais elevados também teriam os valores alterados, assim, pode-se inferir que o efeito adverso presenciado neste grupo de animais pode não ter ocorrido pela administração da própolis. Apesar deste efeito, os níveis enzimáticos observados estão abaixo dos reportados para frangos de corte aos 21 dias de idade, valor este de 221 U/I (Borsa et al., 2006).

Neste contexto, Denli et al. (2005) encontraram resultados semelhantes em codornas alimentadas com dietas contendo própolis, no entanto, quando comparado ao grupo que recebeu suplementação de antibiótico, observou-se que os níveis da enzima foram inferiores ao deste grupo, predizendo um efeito hepatoprotetor da própolis.

### **Conclusão**

A adição de 1000 a 5000 ppm de EEP na dieta pré-inicial de frangos de corte comprometeu o desempenho nesta fase. O EEP promoveu melhorias na morfometria intestinal e atividade da enzima sacarase aos 21 dias de idade, com consequente recuperação dos parâmetros de desempenho e rendimento de carcaça aos 42 dias de idade, sendo sugerida sua inclusão, na dieta de frangos de corte, a partir de sete dias de idade.

### Referências

- ALVES, MJQF; MESQUITA, FF; SAKAGUTI, M et al. Efeito hipocolesterolêmico dos ácidos caféicos da própolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p. 100-105, 2008.
- BANKOVA, VS; CASTRO, SL; MARCUCCI, MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.
- BARBOSA, AA; MÜLLER, ES; MORAES, GHK et al. Perfil da aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase e biometria do fígado de codornas japonesas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.2, p. 308-312, 2010.
- BARTH, OM; DUTRA, VML; JUSTO, RL. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil Meridional. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p. 663-667, 1999.
- BORATTO, AJ; LOPES, DC; OLIVEIRA, RFM et al. Uso de antibiótico, de probiótico e de homeopatia, em frangos de corte criados em ambiente de conforto, inoculados ou não com *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.6, p. 1477-1485, 2004.
- BORSA, A; KOHAYAGAWA, A; BORETTI, LP et al. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p. 675-677, 2006.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizind the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA, LC; ALVES, MP. A cafeína como recurso ergogênico nos exercícios de *endurance*. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.8, n.3, p.33-37, 2000.
- BURDOCK, GA. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 347-363, 1998.
- BURIOL, L; FINGER, D; SCHMIDT, EM et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v.32, n.2, p. 296-302, 2009.
- CABRAL, ISR; OLDONI, TLC; PRADO, A et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1523-1527, 2009.
- CUNHA, IBS; SAWAYA, ACHF, CAETANO, FM et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 6, p. 964-970, 2004.
- DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v.7, p. 447-454, 1964.
- DENLI, M; CANKAYA, S; SILICI, S et al. Effect of dietary addition of Turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Animal Science**, v. 18, n. 6, p. 848-854, 2005.
- ERLANGER, BF; EDEL, F; COOPER, AG. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v.115, p. 206-210, 1966.
- FRANCO, SS; ROSA, AP; LENGLER, S et al. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p. 1765-1771, 2007.
- FU, S; YANG, M; WEN, H et al. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.13, n.1, p. 43-50, 2005.

- GALAL, A; ABD EL-MOTAAL, AM; AHMED, AMH et al. Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.3, p. 272-278, 2008.
- GARCIA, RC; SÁ, MEP; LANGONI, H et al. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhas jovens. **Acta Scientiarum, Animal Sciences**, v.26, n.1, p. 57-67, 2004.
- GONÇALVES, R; SOARES, S; MATEUS, N et al. Inhibition of trypsin by condensed tannins and wine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p. 7596–7601, 2007.
- GUO, FC; WILLIAMS, BA, KWAKKEL, RP et al. Effects of mushroom and herb polysaccharides, as alternatives for an antibiotic, on the cecal microbial ecosystem in broiler chicken. **Poultry Science**, v. 83, p. 175-182, 2004.
- HANHINEVA, K; TÖRRÖNEN, R; BONDIA-PONS, I et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v.11, p. 1365-1402, 2010.
- JAMROZ, D; WERTELEKI, T; HOUSZKA, M et al. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.90, p. 255-268, 2006.
- JIN, LZ; HO, YW; ABDULLAH, N et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, v.77, p. 1259-1265, 1998.
- JOHNSTON, KL; CLIFFORD, MN; MORGAN, LM. Possible role for apple juice phenolic, compounds in the acute modification of glucose tolerance and gastrointestinal hormone secretion in humans. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p. 1800-1805, 2002.
- KAKADE, ML; RACKIS, JJ; MCGHEE, JG. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p. 376-382, 1974.
- KANASHIRO, AMI; BOTTINO, JÁ; FERREIRA, F et al. Influência da administração contínua de probiótico a frangos de corte sobre atividades enzimáticas séricas e concentração de colesterol sérico. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.68, n.2, p. 11-17, 2001.
- KWON, O; ECK, P; CHEN, S et al. Inhibition of the intestinal glucose transporter GLUT2 by flavonoids. **FASEB Journal**, v.21, p. 366-377, 2007.
- LODDI, MM; GONZALES, E; TAKITA, TS et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.4, p. 1124-1131, 2000.
- LONGHINI, R; RAKSA, SM; OLIVEIRA, ACP et al. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade fúngica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17,n.3, p. 388-395, 2007.
- LOTFY, M. Biological activity of bee própolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, p. 22-31, 2006.
- LUNA, GC. **Manual of histologic staining methods of the armed forces**. Institut of pathology. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, p. 285, 1968.
- MANI, F; DAMASCENO, HCR; NOVELLI, ELB et al. Propolis: effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, n.1-2, p. 95-98, 2006.

- MARCUCCI, MC. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p. 529-536, 1996.
- MATSUI, T; EBUCHI, S; FUJISE, T et al. Strong antihyperglycemic effects of water-soluble fraction of Brazilian propolis and its bioactive constituent, 3,4,5-tri-O-caffeoylquinic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.27, p. 1797-1803, 2004.
- MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **Arq. Inst. Biol.**, v.72, n.3, p. 405-411, 2005.
- MESQUITA, FF; RUEDA, BZ; TARDIVO, AC et al. Efeitos da fração flavonoídica da própolis sobre o metabolismo de colesterol, em coelhos com hipercolesterolemia experimental. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.1, p. 44-50, 2007.
- MILES, RD; BUTCHER, GD; HENRY, PR et al. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. **Poultry Science**, v.85, p. 476-485, 2006.
- MOHAMMADZADEH, S; SHARIATPANAH, M; HAMED, M et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chemistry**, v.103, p. 1097-1103, 2007.
- OLIVEIRA, MC; RODRIGUES, EA; MARQUES, RH et al. Performance and morphology of intestinal mucosa of broilers fed mannan-oligosaccharides and enzymes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p. 442-448, 2008.
- OLIVEIRA, TT; NAGEM, TJ; PINTO, AS et al. Efeito de antocianina e própolis em diabetes induzidas em coelhos. **Medicina, Ribeirão Preto**, v.35, p. 464-469, 2002.
- OLIVEIRA, TT; SILVA, RR; DORNAS, WS et al. Flavonóides e aterosclerose. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p.49-54, 2010.
- PIERPOINT, WS. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v.244, p. 65-74, 2004.
- RIMM, EB; KATAN, MB; ASCHERIO, A et al. Relation between intake of flavonoids and risk for coronary heart disease in male health professionals. **Annals of Internal Medicine**, v.125, n.5, p. 384-389, 1996.
- ROSTAGNO, HS; ALBINO, LFT; DONZELE, JL et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186p.
- SALANTINO, A; TEIXEIRA, EW; NEGRI, G et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**, v.2, n.1, p. 33-38, 2005.
- SAYRAFI, R; SHAHROOZ, R; SOLTANALINEJAD, F et al. Histomorphometrical study of the prebiotic effects on intestine morphology and growth performance of broiler chickens. **Veterinary Research Forum**, v.2, n.1, p. 45-51, 2011.
- SHALMANY, SK; SHIVAZAD, M. The effect of diet propolis supplementation on ross broiler chicks performance. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p. 84-88, 2006.
- SILVA, MA; PESSOTTI, BMS; ZANINI, SF et al. Intestinal muosa structure of broiler chickens infected experimentally with *Eimeria tenella* and treated with essential oil of oregano. **Ciência Rural**, v.39, n.5, p. 1471-1477, 2009.
- SILVA, RA; RODRIGUES, AE; RIBEIRO, MCM et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p. 1842-1848, 2006.

- SINGLETON, VL; ROSSI Jr, JA. Colorimetry of total phenolics whit phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p. 144-158, 1965.
- SOUSA, JPB; FURTADO, NAJC; JORGE, R et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 85-93, 2007.
- SKOPEC, MM; GREEN, AK; KARASOV, WH. Flavonoids have differential effects on glucose absorption in rats (*Rattus norvegicus*) and american robins (*Turdus migratorius*). **Journal of Chemical Ecology**, v.36, p. 236-243, 2010.
- TAHERI, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Humoral immunity of broilers is affected by oil extracted propolis (OEP) in the diet. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.6, p.414-417, 2005.
- TATLI SEVEN, PT. The effects of dietary Turkish propolis and vitamin C on performance, digestibility, egg production and egg quality in laying hens under different environmental temperatures. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.21, n.8, p. 1164-1170, 2008a.
- TATLI SEVEN, P; SEVEN, I; YILMZA, M et al. The effects of Turkish propolis on growth and carcass characteristics in broilers under heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v.146, p. 137-148, 2008b.
- TATLI SEVEN, PT; YILMAZ, S; SEVEN, I et al. Effects of propolis on selected blood indicators and antioxidant enzyme activities in broilers under heat stress. **Acta Veterinaria BRNO**, v.78, p. 75-83, 2009.
- TEKELI, A; KUTLU, HR; ÇELIK, L. Effects of *Z. officinale* and propolis extracts on the performance, carcass and some blood parameters of broiler chicks. **Current Research in Poultry Science**, v.1, n.1, p. 12-23, 2011.
- WINDISCH, W; SCHEDLE, K; PLITZNER, C et al. Use of phytogetic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v.86 (E-suppl.), p. E140-E148, 2008.
- YOU, Q; CHEN, F; WANG, X et al. Inhibitory effects of muscadine anthocyanins on  $\alpha$ -glucosidase and pancreatic lipase activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p. 9506-9511, 2011.
- ZIARAN, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Effect of dietary oil extract of própolis on immune response and broiler performance. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.10, p. 1485-1490, 2005.



#### **IV – Efeito da suplementação de própolis bruta sobre o desempenho produtivo, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas digestivas de frangos de corte**

**Resumo** – O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de diferentes níveis de própolis bruta sobre o desempenho, parâmetros de carcaça, peso dos órgãos do trato gastrointestinal, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas intestinais e pancreáticas de frangos de corte. Foram utilizados 1020 pintos de corte, machos, distribuídos em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, composto por seis tratamentos, constituindo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta (0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm), com cinco repetições e 34 aves por unidade experimental. As dietas experimentais foram ministradas do 1° ao 21° dia de vida das aves, sendo posteriormente, fornecida uma ração única à base de milho e farelo de soja. A suplementação de própolis bruta na ração não afetou ( $P>0,05$ ) o ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar durante todo o período experimental (1 a 42 dias de idade). Aos sete e 21 dias, observou-se comportamento linear e quadrático ( $P<0,05$ ) para peso relativo da moela e intestino grosso, respectivamente, com menor peso relativo do intestino grosso ao nível de 278 ppm de própolis bruta. Para os órgãos intestino delgado, fígado e pâncreas e comprimento do intestino delgado não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) em ambas as idades. Aos 21 dias de idade, observou-se comportamento quadrático ( $P<0,05$ ) para profundidade de cripta no íleo, com maior profundidade encontrada ao nível de 323 ppm de própolis bruta. A altura dos vilos, profundidade de cripta e relação vilo:cripta no duodeno e jejuno não foram alterados ( $P>0,05$ ). A atividade das dissacaridases intestinais não foi alterada ( $P>0,05$ ) na fase pré-inicial nos diferentes segmentos do intestino delgado, no entanto, aos 21 dias, observou-se efeito linear crescente ( $P<0,05$ ) para sacarase no jejuno e efeito quadrático ( $P<0,05$ ) para maltase no íleo, com maior atividade encontrada ao nível de 292 ppm de própolis bruta. Com relação às enzimas pancreáticas somente a amilase apresentou sua atividade reduzida ( $P<0,05$ ) nos animais alimentados com 100 e 300 ppm de própolis bruta aos 21 dias de idade. A suplementação de própolis bruta proporcionou efeito linear positivo ( $P<0,05$ ) sobre o rendimento de carcaça dos animais aos 42 dias, no entanto, não alterou ( $P>0,05$ ) o rendimento de cortes (peito, perna e asa). Não foram observadas modificações ( $P>0,05$ ) quanto ao nível de triglicérides e atividade enzimática da alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, no entanto, os animais alimentados com rações contendo 400 e 500 ppm de própolis bruta apresentaram maiores níveis séricos ( $P<0,05$ ) de colesterol, quando comparados ao tratamento controle. A adição de própolis bruta nas rações não influenciou os parâmetros de desempenho, apesar dos benefícios quanto ao rendimento de carcaça e morfofisiologia intestinal.

**Palavras-chave:** aditivo natural, atividade antibacteriana, dissacaridases, enzimas pancreáticas

#### **IV – Supplementation effect of crude propolis on performance, intestinal morphometry, biochemical profile and digestive enzyme activity of broiler chickens**

**Abstract** – The present study aimed to evaluate the effect of different levels of crude propolis on performance, carcass parameters, weight of gastrointestinal organs, intestinal morphometry, biochemical profile and intestinal and pancreatic enzyme activity of broiler chickens. 1,020 male broiler chicks were assigned in a completely randomized design to six treatments (crude propolis supplement levels of 0, 100, 200, 300, 400 and 500 ppm), five replications and 34 birds per experimental unit. The experimental diets were administered from 1 to 21 days of age, and the birds were subsequently provided a ration based on corn and soybean meal. The crude propolis supplementation did not affect ( $P>0.05$ ) weight gain, feed intake and feed conversion. On the 7<sup>th</sup> and the 21<sup>st</sup> days there was a linear and quadratic response ( $P<0.05$ ) for relative weight of gizzard and large intestine, respectively, which predicted a lower relative weight of the large intestine at a dose of 278 ppm of crude propolis. For the small intestine, liver and pancreas and small intestine length there were no differences ( $P>0.05$ ) at both ages. On the 21<sup>st</sup> day there was a quadratic response ( $P<0.05$ ) to crypt depth in the ileum, with the highest depth at the level of 323 ppm of crude propolis. The height of the villi, crypt depth and villus-to-crypt ratio in the duodenum and jejunum were not affected ( $P>0.05$ ). The intestinal disaccharidase activities were not influenced ( $P>0.05$ ) in the pre-starter phase in the different segments of the small intestine, however, on the 21<sup>st</sup> day there was a linear increase response ( $P<0.05$ ) for sucrase in the jejunum and a quadratic response ( $P<0.05$ ) for maltase in the ileum, which predicted higher activity at a dose of 292 ppm of crude propolis. In relation to pancreatic enzymes, amylase activity was the only one reduced ( $P<0.05$ ) in animals fed with 100 and 300 ppm of crude propolis at 21<sup>st</sup> days. The crude propolis supplementation gave a positive linear effect ( $P<0.05$ ) on carcass yield, however, it did not affect ( $P>0.05$ ) the yield of cuts (breast, leg and wing). No changes were observed ( $P>0.05$ ) in triglyceride level and in alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities, however, treatments with 400 and 500 ppm of crude propolis had higher ( $P<0.05$ ) cholesterol levels compared to control. The addition of crude propolis in diets did not influence the performance parameters, despite the benefits regarding carcass yield and intestinal morphophysiology.

**Key words:** antibacterial activity, disaccharidases, natural additive, pancreatic enzymes

### **Introdução**

A utilização de antibióticos para evitar a colonização de organismos indesejáveis no trato gastrointestinal dos animais, melhorando a performance produtiva destes, foi prática constante na indústria avícola por muitos anos. No entanto, a suposta presença de resíduos de compostos na carne, podendo ser transmitidos aos consumidores, o que poderia ocasionar um quadro de resistência cruzada, fez com que essa atividade fosse banida em alguns países (Pelicano et al., 2004). Desta forma, pesquisas são realizadas com o intuito de identificar possíveis alternativas naturais que possam substituir os comumente utilizados melhoradores de desempenho, com eficiência semelhante, entretanto, sem risco à saúde pública.

A própolis, substância resinosa e balsâmica produzida pelas abelhas pela combinação de extratos extraídos de plantas, cera, pólen e secreções salivares (Salantino et al., 2005), é indicada como possível substituta em virtude da interferência em diversos processos fisiológicos, podendo ocasionar melhorias no desempenho produtivo dos animais (Shalmany & Shivazad, 2006).

As ações mundialmente conhecidas como antioxidante (Hayashi et al., 1999), imunomodulatória (Dimov et al., 1991; Missina & Sforcin, 2008), anti-inflamatória (Almeida & Menezes, 2002), antiviral (Kujumgiev et al., 1999), antibacteriana (Grange & Davey, 1990), entre outras, são baseadas na composição química da própolis, que inclui, polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos, aldeídos aromáticos, ésteres, aminoácidos, minerais e vitaminas (Bankova et al., 2000).

Para sua utilização na medicina humana, a própolis bruta é processada utilizando solventes, normalmente álcool de cereais, que são capazes de extrair os compostos biologicamente ativos da parte sólida (Shalmany & Shivazad, 2006). No entanto, este processo pode levar semanas a meses (Cunha et al., 2004), sem considerar o custo de produção do chamado extrato etanólico de própolis. O extrato poderia ser substituído pela própolis bruta, antes do processamento, a fim de reduzir estes custos de produção. Entretanto, os estudos sobre os benefícios ocasionados sobre o desempenho produtivo dos animais foram obtidos quase que em sua totalidade utilizando o extrato da própolis (Ziaran et al., 2005; Tatli Seven et al., 2008).

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes níveis de própolis bruta sobre o desempenho, parâmetros de carcaça, peso dos órgãos do trato

gastrointestinal, morfometria intestinal, perfil bioquímico e atividade de enzimas intestinais e pancreáticas de frangos de corte.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido no Setor de Avicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM), em um galpão convencional de 30 metros de comprimento e 8 metros de largura, dividido em boxes de 3,85m<sup>2</sup>, com cobertura de telha fibrocimento, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 metros de altura. O material utilizado como cama foi palha de arroz de primeiro uso.

Foram utilizadas 1020 aves de corte de um dia de idade, machos, linhagem Cobb-Vantress, distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, composto por seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão de própolis bruta (0; 100; 200; 300; 400 e 500 ppm), com cinco repetições e 34 aves por unidade experimental. O tratamento controle (0 ppm) não continha qualquer tipo de aditivo. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 048/2010).

A própolis utilizada neste experimento foi adquirida em Maringá-PR, sendo conservada em temperatura entre 2-8°C até o momento de utilização. A composição do extrato foi determinada de acordo com Singleton & Rossi (1965) e Pierpoint (2004) para polifenóis totais e utilizando o método colorimétrico cloreto de alumínio para o conteúdo de flavonoides totais.

As dietas experimentais foram ministradas do 1° ao 21° dia de vida das aves, sendo posteriormente, fornecida a todas as unidades uma ração única à base de milho e farelo de soja. As dietas foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005) para as fases de um a sete, oito a 21 e 22 a 42 dias de idade (Tabela 1).

As aves e as sobras de rações foram pesadas semanalmente, sendo posteriormente calculados os valores de conversão alimentar, consumo de ração e ganho de peso dos animais para cada repetição. As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas, diariamente, dentro do galpão, foram, respectivamente, de 17°C e 25°C e a umidade relativa média de 55%. O percentual de mortalidade total ficou abaixo dos 3%, sendo considerado, índice normal, não sendo atribuído aos tratamentos aplicados.

Tabela 1- Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Fases (dias)		
	1 a 7	8 a 21	22 a 42
Milho	56,38	59,26	64,45
Farelo de Soja, 45%	36,92	34,27	28,68
Óleo de Soja	1,99	2,30	3,15
Calcário	0,92	0,88	0,82
Fosfato Bicálcico	1,94	1,80	1,58
Sal	0,40	0,40	0,40
Inerte*	0,20	0,20	-
DL- Metionina, 98%	0,35	0,24	0,23
L- Lisina HCl, 78%	0,35	0,19	0,23
L- Treonina, 98%	0,15	0,05	0,06
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	0,40	0,40	0,40
Total	100	100	100
Valores calculados			
PB (%)	22,04	20,79	18,72
EMA (kcal/kg)	2,950	3,000	3,125
Cálcio (%)	0,939	0,884	0,793
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442	0,395
Met + Cis, dig (%)	0,944	0,814	0,752
Lisina, dig (%)	1,330	1,146	1,045
Treonina, dig (%)	0,865	0,745	0,679
Triptofano, dig (%)	0,213	0,183	0,177

<sup>1</sup>(1-21 dias de idade) Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.916.670 UI/kg; Vit. D3 583.330 UI/kg; Vit. E 8.750 UI/kg; Vit. K3 433.33 mg/kg; Vit. B1 408.33 mg/kg; Vit. B2 1.333,33 mg/kg, Vit. B12 4.166,67 mcg/kg; Niacina 8.983,33 mg/kg; Pantotenato de cálcio 3.166,67 mg/kg; Ácido Fólico 200 mg/kg; Biotina 25 mg/kg. Suplemento Mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.6 g/kg; Cobre 3.072 mg/kg; Iodo 248 mg/kg; Zinco 12.6 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 61.20 mg/kg; Cobalto 50.40 mg/kg.

<sup>1</sup>(22-42 dias de idade) Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.250.000 UI/kg; Vit. D3 450.000 UI/kg; Vit. E 7.000 UI/kg; Vit. K3 418 mg/kg; Vit. B1 300 mg/kg; Vit. B2 1000 mg/kg, Vit. B12 3000 mcg/kg; Niacina 7000 mg/kg; Pantotenato de Cálcio 2500 mg/kg; Ácido Fólico 140 mg/kg; Biotina 14 mg/kg. Suplemento mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.5 g/kg; Cobre 3000 mg/kg; Iodo 250 mg/kg; Zinco 12.5 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 75 mg/kg; Cobalto 50 mg/kg.

\*A própolis foi adicionada as rações em substituição ao inerte.

Aos sete e aos 21 dias de idade, cinco aves de cada tratamento, com peso representativo (média±5%), foram abatidas por insensibilização elétrica seguida de deslocamento cervical, para determinação do peso relativo (% do peso vivo) dos órgãos do trato gastrointestinal (proventrículo, moela, intestino delgado, intestino grosso, pâncreas e fígado), comprimento do intestino delgado e colheita de fragmentos (duodeno, jejuno e íleo) para análise da morfometria intestinal por microscopia de luz e análise da atividade de enzimas intestinais e pancreáticas. Para a amostragem dos segmentos, considerou-se o duodeno a partir do piloro até a porção distal da alça duodenal, jejuno, desde a porção distal da alça duodenal até o divertículo de Meckel e íleo, porção cranial aos cecos.

Para as análises morfométricas fragmentos de dois cm de cada segmento foram abertos longitudinalmente, lavados com solução salina, fixados em solução de formalina tamponada (10%) e em seguida desidratados em uma série de concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Luna, 1968). Após a microtomia semisseriada, cortes de sete  $\mu\text{m}$ , os cortes foram corados pela técnica de hematoxilina e eosina.

As análises morfométricas (30 leituras/amostra) foram realizadas utilizando o sistema de imagens Motic Image Plus 2.0. As alturas das vilosidades foram tomadas a partir da região basal, que coincide com a porção superior das criptas até o ápice, e as criptas, da base até a região de transição cripta:vilo.

Os segmentos, livres de resíduos alimentares, destinados à determinação da atividade das enzimas digestivas, foram congelados em nitrogênio líquido e estocados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises. Para determinar a atividade das dissacaridases intestinais (sacarase e maltase) pelo método proposto por Dahlquist (1964), cada segmento foi aberto longitudinalmente e a mucosa raspada e homogeneizada após a adição de quatro partes de água destilada. Alíquotas do homogeneizado foram incubadas com substratos apropriados (sacarose ou maltose) em solução tampão malato pH 6,4. A glicose liberada durante a reação foi determinada pelo método de glicose-oxidase, utilizando-se kit comercial (*Gold Analisa Diagnóstica*).

A atividade das enzimas pancreáticas foi determinada após o pâncreas ser homogeneizado (1:20 peso/volume) em solução tampão 50 mM Tris-HCl pH 8,0 contendo 50 mM  $\text{CaCl}_2$ . A atividade da tripsina foi determinada pela hidrólise de p-nitroaniline benzoyl-DL-argininine (BAPNA) em pH 8,2 após a ativação do tripsinogênio (Kakade et al. 1974). A reação foi interrompida com solução de ácido acético 3%. Método similar foi utilizado para determinação da quimiotripsina (Erlanger et al., 1966), substituindo o substrato BAPNA por N-glutaryl-L-phenylalanine-p-nitroanilide (GAPNA). A amilase foi determinada por método iodométrico utilizando kit comercial (*Gold Analisa Diagnóstica*). A atividade da lipase foi determinada pelo método BALB-DNTP utilizando kit comercial (*Gold Analisa Diagnóstica*). Os resultados referentes à atividade das enzimas intestinais e pancreáticas foram expressos por mg de proteína do tecido, a qual foi determinada pelo método de Bradford (1976).

Aos 21 dias de idade, foram colhidas amostras de sangue por punção da veia jugular de cinco aves por tratamento. Parte da alíquota foi adicionada anticoagulante

(EDTA) para obtenção do plasma sanguíneo e destinado às análises de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). O restante foi dessorido e o soro reservado para mensuração de colesterol total e triglicérides. As análises foram realizadas utilizando kits comerciais (*Gold Analisa Diagnóstica*).

Ao final do período experimental (42 dias de idade), dez aves representando a média de peso do tratamento ( $\pm 5\%$ ) foram submetidas a jejum alimentar de oito horas e abatidas para determinação das características de carcaça. Após a insensibilização por choque elétrico, as aves foram sacrificadas, sangradas, depenadas e evisceradas. Para o rendimento de carcaça utilizou-se o peso da carcaça eviscerada (sem cabeça, pés, pescoço e gordura abdominal) em relação ao peso da ave viva antes do abate e para o rendimento de cortes (peito, asa e perna) foi considerado o peso da carcaça eviscerada. Considerando como gordura abdominal aquela depositada próxima à bolsa cloacal e moela.

Como procedimento estatístico, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial por intermédio do programa SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 1997). Para comparação de resultados entre o tratamento controle com cada um dos níveis de inclusão de própolis bruta foi utilizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade. Os dados foram analisados segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ij} = b_0 + b_1A_i + b_2A_i + e_{ij}$$

em que:

$Y_{ij}$  = valor observado das variáveis estudadas relativo a cada unidade experimental  $j$  submetida à ração com nível  $i$  de própolis bruta,  $i = 0; 100; 200; 300; 400; 500$  ppm;

$b_0$  = constante;

$b_1, b_2$  = são, respectivamente, coeficientes linear e quadrático de regressão da variável dependente em função dos níveis de própolis bruta;

$e_{ij}$  = erro aleatório associado a cada observação  $Y_{ij}$ .

### **Resultados e Discussões**

A própolis bruta utilizada neste experimento apresentou concentração de 78,75 mg/L de polifenóis totais e 11,95 mg/L de flavonoides totais em sua composição. Os valores obtidos demonstram qualidade adequada, estando em concordância com valores

reportados na literatura (Funari & Ferro, 2006) e com os requisitos mínimos exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, 5% e 0,5% para polifenóis e flavonoides totais, respectivamente (Instrução Normativa nº3 –Anexo VI, 2001).

Sabe-se que a variabilidade na composição química da própolis é dependente da vegetação originária, posição geográfica, características climáticas e genéticas das abelhas (Bankova, 2005), assim, o controle de sua qualidade se dá através da determinação da concentração destes compostos (Fu et al., 2005).

Embora os teores de polifenóis e flavonoides presentes na própolis tenham atendido os padrões recomendados, os resultados de desempenho mostraram que as aves alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de inclusão da própolis bruta, até os 21 dias de idade, não tiveram o desempenho produtivo afetado ( $P>0,05$ ) em todo o período experimental (Tabela 2). Da mesma forma, não foi detectada diferença ( $P>0,05$ ) entre o tratamento controle e os animais alimentados com própolis bruta.

Resultados positivos sobre o desempenho dos animais são relatados com a utilização de extrato etanólico de própolis nas dietas, principalmente pelo fato dos flavonoides, composto presente em maior concentração, possuírem atividades antibacterianas (Grange & Davey, 1990), sendo capaz de dificultar a aderência de bactérias patogênicas (Jamroz et al., 2006; Windisch et al., 2008), proporcionando melhora na saúde intestinal, e conseqüentemente nos processos digestivos e absorptivos (Denli et al., 2005).

Os parâmetros produtivos observados neste estudo podem não ter sido alterados porque o ingrediente utilizado se encontrava na forma bruta, sem processamento. Em hipótese, os constituintes biologicamente ativos na própolis bruta estão complexados com compostos insolúveis, dentre eles, cera, matéria orgânica, tecidos vegetais e grãos de pólen, retirados durante o processamento de obtenção do extrato (Burdock, 1998). Assim, os elementos funcionais podem não ter sido disponibilizados em sua totalidade para o organismo das aves ou os níveis utilizados foram abaixo do necessário para modificação das características de desempenho.



Tabela 2 - Desempenho ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Ganho de Peso, g	Consumo de Ração, g	Conversão Alimentar
Controle	123,44 $\pm$ 2,10	170,93 $\pm$ 4,223	1,386 $\pm$ 0,04
100 ppm	123,87 $\pm$ 2,62	170,40 $\pm$ 2,797	1,377 $\pm$ 0,03
200 ppm	128,38 $\pm$ 2,89	178,36 $\pm$ 4,927	1,394 $\pm$ 0,06
300 ppm	124,90 $\pm$ 2,62	171,52 $\pm$ 2,635	1,375 $\pm$ 0,03
400 ppm	122,66 $\pm$ 1,35	174,71 $\pm$ 2,875	1,425 $\pm$ 0,03
500 ppm	125,83 $\pm$ 3,15	170,92 $\pm$ 0,928	1,361 $\pm$ 0,03
CV (%)	4,37	4,37	6,17
Regressão	ns	ns	ns
1 a 21 dias			
Controle	878,97 $\pm$ 12,03	1296,64 $\pm$ 21,04	1,476 $\pm$ 0,02
100 ppm	886,53 $\pm$ 20,31	1319,23 $\pm$ 24,90	1,490 $\pm$ 0,03
200 ppm	885,01 $\pm$ 22,92	1357,47 $\pm$ 14,28	1,538 $\pm$ 0,04
300 ppm	877,17 $\pm$ 22,27	1333,61 $\pm$ 25,64	1,525 $\pm$ 0,05
400 ppm	888,74 $\pm$ 18,08	1343,87 $\pm$ 28,97	1,513 $\pm$ 0,02
500 ppm	855,36 $\pm$ 15,44	1279,19 $\pm$ 36,83	1,496 $\pm$ 0,04
CV (%)	4,81	4,43	5,48
Regressão	ns	ns	ns
1 a 42 dias			
Controle	2903,65 $\pm$ 32,52	5198,17 $\pm$ 90,51	1,790 $\pm$ 0,02
100 ppm	2888,47 $\pm$ 53,08	5095,12 $\pm$ 62,89	1,767 $\pm$ 0,04
200 ppm	2896,38 $\pm$ 36,24	5187,45 $\pm$ 65,99	1,792 $\pm$ 0,04
300 ppm	2879,46 $\pm$ 23,94	5159,45 $\pm$ 38,36	1,792 $\pm$ 0,01
400 ppm	2855,40 $\pm$ 33,32	5161,54 $\pm$ 69,94	1,808 $\pm$ 0,01
500 ppm	2802,74 $\pm$ 17,05	5051,67 $\pm$ 41,71	1,803 $\pm$ 0,02
CV (%)	2,78	2,86	3,48
Regressão	ns	ns	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P>0,05$ )

ns = não significativo

Quanto às relações corporais, peso relativo dos órgãos do trato gastrointestinal e comprimento do intestino delgado, aos sete e 21 dias de idade, observou-se interferência dos níveis de inclusão de própolis bruta apenas para a variável moela aos sete dias, proporcionando redução linear ( $P<0,05$ ) e para o peso relativo do intestino grosso aos 21 dias, apresentando comportamento quadrático ( $P<0,05$ ), com o menor peso atingido ao nível de 278 ppm de própolis bruta. Quando comparando cada nível de inclusão de própolis bruta com o tratamento controle não houve diferença ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 - Peso relativo (%) dos órgãos do trato gastrointestinal e comprimento do intestino delgado (cm) ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Proventrículo	Moela	Intestino Delgado	Comprimento Intestino Delgado	Intestino Grosso	Fígado	Pâncreas
7 dias							
Controle	1,194 $\pm$ 0,03	4,515 $\pm$ 0,09	7,645 $\pm$ 0,17	108,750 $\pm$ 1,57	1,219 $\pm$ 0,08	3,821 $\pm$ 0,12	0,556 $\pm$ 0,03
100 ppm	1,154 $\pm$ 0,03	4,807 $\pm$ 0,23	7,854 $\pm$ 0,29	107,450 $\pm$ 2,29	1,321 $\pm$ 0,11	3,635 $\pm$ 0,10	0,580 $\pm$ 0,01
200 ppm	1,135 $\pm$ 0,00	4,246 $\pm$ 0,23	7,647 $\pm$ 0,19	108,250 $\pm$ 2,17	1,190 $\pm$ 0,10	3,832 $\pm$ 0,14	0,545 $\pm$ 0,02
300 ppm	1,225 $\pm$ 0,07	4,501 $\pm$ 0,07	7,979 $\pm$ 0,51	107,150 $\pm$ 1,38	1,094 $\pm$ 0,05	3,915 $\pm$ 0,05	0,543 $\pm$ 0,02
400 ppm	1,178 $\pm$ 0,08	4,245 $\pm$ 0,06	7,726 $\pm$ 0,16	109,700 $\pm$ 2,36	1,228 $\pm$ 0,05	3,741 $\pm$ 0,04	0,533 $\pm$ 0,03
500 ppm	1,178 $\pm$ 0,04	4,150 $\pm$ 0,17	7,925 $\pm$ 0,40	104,700 $\pm$ 1,41	1,233 $\pm$ 0,03	3,947 $\pm$ 0,10	0,571 $\pm$ 0,02
CV (%)	9,47	8,10	9,14	3,97	14,28	5,73	8,93
Regressão	ns	Linear <sup>1</sup>	ns	ns	ns	ns	ns
21 dias							
Controle	0,662 $\pm$ 0,03	2,505 $\pm$ 0,15	4,893 $\pm$ 0,24	165,300 $\pm$ 2,48	0,815 $\pm$ 0,01	2,779 $\pm$ 0,12	0,389 $\pm$ 0,02
100 ppm	0,624 $\pm$ 0,03	2,405 $\pm$ 0,06	5,142 $\pm$ 0,32	158,400 $\pm$ 1,58	0,778 $\pm$ 0,05	2,853 $\pm$ 0,12	0,347 $\pm$ 0,02
200 ppm	0,567 $\pm$ 0,02	2,499 $\pm$ 0,28	4,813 $\pm$ 0,21	157,700 $\pm$ 3,55	0,650 $\pm$ 0,05	2,780 $\pm$ 0,06	0,351 $\pm$ 0,02
300 ppm	0,585 $\pm$ 0,05	2,615 $\pm$ 0,24	5,101 $\pm$ 0,14	165,300 $\pm$ 4,87	0,705 $\pm$ 0,04	3,003 $\pm$ 0,08	0,360 $\pm$ 0,02
400 ppm	0,630 $\pm$ 0,03	2,562 $\pm$ 0,15	4,710 $\pm$ 0,21	164,750 $\pm$ 1,70	0,708 $\pm$ 0,01	3,046 $\pm$ 0,11	0,357 $\pm$ 0,01
500 ppm	0,623 $\pm$ 0,03	2,653 $\pm$ 0,14	5,033 $\pm$ 0,41	163,300 $\pm$ 5,61	0,812 $\pm$ 0,06	2,910 $\pm$ 0,22	0,366 $\pm$ 0,02
CV (%)	12,47	16,22	12,00	4,18	13,54	9,80	11,88
Regressão	ns	ns	ns	ns	Quadrática <sup>2</sup>	ns	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett (P>0,05)

ns = não significativo

<sup>1</sup> Y = 4,78459 - 0,00131574x (R<sup>2</sup> = 0,61); (P=0,02)

<sup>2</sup> Y = 0,897949 - 0,00163315x + 0,00000293398x<sup>2</sup> (R<sup>2</sup>=0,83); (P=0,04); Ponto de mínima: 278 ppm

Como não foram observadas alterações no desempenho no período inicial de criação, a variação no peso relativo da moela não está correlacionada ao menor peso corporal ou consumo de ração, não possuindo evidência suficiente para inferir que a inclusão da própolis bruta possa ter prejudicado o desenvolvimento do órgão no início de vida das aves.

A redução do peso relativo do intestino grosso pode estar relacionada à atividade antibacteriana da própolis podendo reduzir a presença de bactérias patogênicas produtoras de toxinas (Rahmani & Speer, 2005) aderidas ao epitélio, reduzindo sua espessura e conseqüentemente seu peso. Da mesma forma, o efeito redutor do peso do trato gastrointestinal em animais alimentados com dietas contendo antibióticos foi relatado por Miles et al. (2006).

Os diferentes níveis de inclusão de própolis bruta não alteraram ( $P > 0,05$ ) os valores de altura dos vilos, profundidade de cripta e relação vilo:cripta no duodeno e jejuno dos animais aos sete e aos 21 dias de idade. Para o segmento íleo aos sete dias de idade não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ), no entanto, aos 21 dias, detectou-se comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ) para profundidade de cripta, com maior valor encontrado ao nível de 323 ppm. Os tratamentos com nível de inclusão de 200, 300 e 400 ppm de própolis bruta apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) profundidade de cripta aos 21 dias quando comparado ao tratamento controle.

Modificações quanto à profundidade de cripta podem estar relacionadas a duas diferentes situações, no entanto com a mesma função, reposição de enterócitos. As vilosidades podem estar se desenvolvendo rapidamente necessitando de células para o crescimento, por outro lado, esta síntese também pode ocorrer quando há danos na mucosa intestinal, necessitando desta forma, de células para sua renovação (Sayrafi et al., 2011).

Observa-se que, embora não tenha sido significativo, houve maiores valores quanto a altura dos vilos no íleo para os tratamentos com própolis bruta, subentendendo que a maior profundidade de cripta neste estudo, alcançada com o nível de inclusão de 323 ppm possa ter ocorrido por este motivo, havendo a necessidade de uma maior demanda de enterócitos para o desenvolvimento das vilosidades. Neste contexto, diversos autores relatam melhorias quanto aos índices histológicos da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com aditivos naturais (Pelicano et al., 2005; Awad et al., 2009; Tekeli et al., 2010; Viveros et al., 2011).

Tabela 4 - Altura de vilo ( $\mu\text{m}$ ), profundidade de cripta ( $\mu\text{m}$ ) e relação altura de vilo:profundidade de cripta ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta.

	Níveis de Própolis Bruta						CV	Reg
	Controle	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 ppm		
7 dias								
Altura de Vilo								
Duodeno	1034,47 $\pm$ 32,89	1082,12 $\pm$ 50,35	1038,48 $\pm$ 36,46	1051,08 $\pm$ 24,85	1116,20 $\pm$ 26,54	1083,45 $\pm$ 55,83	8,26	ns
Jejuno	459,02 $\pm$ 45,05	527,76 $\pm$ 54,31	461,81 $\pm$ 13,66	463,92 $\pm$ 25,34	487,65 $\pm$ 10,35	469,42 $\pm$ 33,35	16,32	ns
Íleo	418,52 $\pm$ 19,86	378,99 $\pm$ 24,04	387,83 $\pm$ 13,67	401,84 $\pm$ 10,65	380,94 $\pm$ 32,11	412,11 $\pm$ 28,07	12,79	ns
Profundidade de Cripta								
Duodeno	159,90 $\pm$ 3,00	150,89 $\pm$ 8,11	159,14 $\pm$ 5,38	158,03 $\pm$ 5,12	153,98 $\pm$ 10,73	156,89 $\pm$ 9,84	10,97	ns
Jejuno	118,73 $\pm$ 11,41	119,62 $\pm$ 4,41	113,97 $\pm$ 2,16	120,93 $\pm$ 8,78	107,16 $\pm$ 2,71	117,10 $\pm$ 4,70	12,88	ns
Íleo	103,10 $\pm$ 2,48	98,32 $\pm$ 2,25	94,84 $\pm$ 2,37	98,07 $\pm$ 4,38	90,06 $\pm$ 3,02	96,63 $\pm$ 5,41	8,13	ns
Relação altura de vilo:profundidade de cripta								
Duodeno	6,46 $\pm$ 0,09	7,25 $\pm$ 0,54	6,57 $\pm$ 0,36	6,69 $\pm$ 0,36	7,39 $\pm$ 0,53	6,94 $\pm$ 0,27	12,95	ns
Jejuno	3,87 $\pm$ 0,11	4,38 $\pm$ 0,32	4,06 $\pm$ 0,17	3,91 $\pm$ 0,30	4,55 $\pm$ 0,03	4,01 $\pm$ 0,23	12,18	ns
Íleo	4,07 $\pm$ 0,23	3,86 $\pm$ 0,25	4,11 $\pm$ 0,22	4,13 $\pm$ 0,20	4,21 $\pm$ 0,25	4,26 $\pm$ 0,11	11,70	ns
21 dias								
Altura de Vilo								
Duodeno	1811,12 $\pm$ 126,27	1738,77 $\pm$ 123,42	1757,00 $\pm$ 29,25	1775,87 $\pm$ 58,02	1676,76 $\pm$ 43,31	1599,77 $\pm$ 34,09	8,26	ns
Jejuno	665,69 $\pm$ 56,35	770,59 $\pm$ 53,75	790,86 $\pm$ 50,03	796,81 $\pm$ 26,35	780,48 $\pm$ 13,38	817,15 $\pm$ 12,91	10,53	ns
Íleo	548,92 $\pm$ 32,99	567,30 $\pm$ 35,03	588,20 $\pm$ 24,15	627,68 $\pm$ 41,49	630,81 $\pm$ 49,58	567,56 $\pm$ 46,13	14,81	ns
Profundidade de Cripta								
Duodeno	153,87 $\pm$ 6,42	162,10 $\pm$ 9,59	156,86 $\pm$ 7,28	157,78 $\pm$ 7,97	153,25 $\pm$ 5,00	160,27 $\pm$ 6,53	10,05	ns
Jejuno	115,56 $\pm$ 6,99	125,99 $\pm$ 6,26	133,91 $\pm$ 2,64	120,12 $\pm$ 6,70	127,06 $\pm$ 5,45	134,24 $\pm$ 3,72	9,18	ns
Íleo	98,07 $\pm$ 3,55	98,44 $\pm$ 4,50	113,45 $\pm$ 2,60*	115,82 $\pm$ 4,15*	118,63 $\pm$ 4,35*	105,01 $\pm$ 5,27	8,52	Q <sup>1</sup>
Relação altura de vilo: profundidade de cripta								
Duodeno	11,82 $\pm$ 1,00	10,76 $\pm$ 0,68	11,29 $\pm$ 0,51	11,33 $\pm$ 0,48	11,05 $\pm$ 0,73	10,06 $\pm$ 0,55	12,24	ns
Jejuno	5,74 $\pm$ 0,14	6,14 $\pm$ 0,42	5,92 $\pm$ 0,44	6,74 $\pm$ 0,51	6,17 $\pm$ 0,21	6,10 $\pm$ 0,14	12,95	ns
Íleo	5,59 $\pm$ 0,21	5,76 $\pm$ 0,27	5,18 $\pm$ 0,17	5,45 $\pm$ 0,40	5,31 $\pm$ 0,35	5,40 $\pm$ 0,31	12,19	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P>0,05$ ); ns = não significativo

<sup>1</sup>  $Y = 76,3652 + 0,261842x - 0,000405884x^2$  ( $R^2 = 0,95$ ); ( $P=0,002$ ); Ponto de máxima: 323 ppm

Assim como a morfometria intestinal, a atividade das dissacaridasas intestinais não foi alterada ( $P>0,05$ ) na fase pré-inicial nos diferentes segmentos do intestino delgado (Tabela 5), no entanto, observaram-se melhorias aos 21 dias de idade. A atividade da sacarase no jejuno foi maior de acordo com o aumento dos níveis ( $P<0,05$ ) e a atividade da maltase no íleo apresentou resposta quadrática ( $P<0,05$ ), com maior atividade ao nível de 292 ppm aos 21 dias. Em estudo similar com inclusão de extrato etanólico de própolis na dieta de frangos de corte também foi demonstrado aumento da atividade da sacarase no jejuno aos 21 dias (dados não publicados). Quando comparado cada nível de inclusão de própolis bruta com o tratamento controle observou-se menor e maior atividade da enzima sacarase ( $P<0,05$ ) no segmento jejuno aos 21 dias ao nível de 200 e 500 ppm, respectivamente.

Sabe-se que as células totipotentes da cripta se dividem várias vezes e migram em direção ao topo das vilosidades, e se diferenciam e expressam enzimas e proteínas transportadoras (Mac Donal et al., 2008). Assim, a maior atividade enzimática nos enterócitos pode estar relacionada a maior profundidade de cripta observada neste estudo, indicando que a inclusão da própolis bruta promoveu maior renovação, migração, maturação celular e expressão de enzimas no epitélio intestinal aos 21 dias, o que conseqüentemente poderia melhorar o aproveitamento dos carboidratos da dieta.

Tabela 5 – Atividade das dissacaridases intestinais (U/mg de proteína) ( $\pm$  erro padrão) nos diferentes segmentos do intestino delgado ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Sacarase Duodeno	Sacarase Jejuno	Sacarase Íleo	Maltase Duodeno	Maltase Jejuno	Maltase Íleo
7 dias						
Controle	2,84 $\pm$ 0,29	5,13 $\pm$ 0,74	4,13 $\pm$ 0,96	14,82 $\pm$ 1,07	19,63 $\pm$ 4,69	17,17 $\pm$ 1,60
100 ppm	4,63 $\pm$ 0,91	4,38 $\pm$ 0,28	8,24 $\pm$ 1,90	21,41 $\pm$ 1,78	14,69 $\pm$ 1,45	28,27 $\pm$ 2,57
200 ppm	4,96 $\pm$ 0,61	2,88 $\pm$ 0,67	7,07 $\pm$ 2,26	22,43 $\pm$ 2,88	10,65 $\pm$ 1,73	22,71 $\pm$ 4,76
300 ppm	4,56 $\pm$ 1,09	4,13 $\pm$ 1,82	6,26 $\pm$ 1,84	15,85 $\pm$ 2,03	15,05 $\pm$ 4,14	18,13 $\pm$ 2,20
400 ppm	3,46 $\pm$ 0,39	4,17 $\pm$ 0,78	4,44 $\pm$ 1,45	18,19 $\pm$ 2,03	11,82 $\pm$ 1,37	25,01 $\pm$ 6,64
500 ppm	4,22 $\pm$ 0,56	6,90 $\pm$ 0,58	5,32 $\pm$ 1,18	21,31 $\pm$ 2,73	18,87 $\pm$ 3,75	24,13 $\pm$ 2,53
CV (%)	39,15	46,53	57,04	27,04	40,04	35,07
Regressão	ns	ns	ns	ns	ns	ns
21 dias						
Controle	3,31 $\pm$ 0,39	5,32 $\pm$ 1,01	5,85 $\pm$ 0,38	22,69 $\pm$ 1,79	31,07 $\pm$ 1,36	34,89 $\pm$ 4,16
100 ppm	3,88 $\pm$ 0,55	3,42 $\pm$ 0,50	4,62 $\pm$ 0,92	23,80 $\pm$ 2,66	21,84 $\pm$ 0,76	28,87 $\pm$ 1,21
200 ppm	3,81 $\pm$ 1,05	2,99 $\pm$ 0,43*	6,28 $\pm$ 1,44	21,00 $\pm$ 5,13	27,93 $\pm$ 4,15	42,32 $\pm$ 4,02
300 ppm	4,41 $\pm$ 0,36	3,39 $\pm$ 0,17	6,26 $\pm$ 0,65	31,06 $\pm$ 3,85	24,31 $\pm$ 2,03	33,52 $\pm$ 3,19
400 ppm	4,83 $\pm$ 1,24	4,64 $\pm$ 0,61	5,54 $\pm$ 1,11	30,68 $\pm$ 5,77	25,85 $\pm$ 3,91	36,81 $\pm$ 2,44
500 ppm	3,79 $\pm$ 0,31	8,20 $\pm$ 0,66*	4,97 $\pm$ 0,51	20,31 $\pm$ 1,11	31,60 $\pm$ 3,58	29,37 $\pm$ 3,17
CV (%)	36,87	45,51	31,03	34,48	25,00	20,01
Regressão	ns	Linear <sup>1</sup>	ns	ns	ns	Quadrática <sup>2</sup>

\*Significativo pelo teste de Dunnett (P>0,05); ns = não significativo

<sup>1</sup> Y = 0,986577 + 0,0115997 (R<sup>2</sup> = 0,68); (P<0,01)

<sup>2</sup> Y = 21,4595 + 0,10909x - 0,000186611x<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,52); (P=0,02); Ponto de máxima: 292 ppm

A atividade das enzimas tripsina, quimiotripsina e lipase não foi influenciada pela inclusão de própolis bruta na dieta aos sete e 21 dias de idade (Tabela 6,  $P>0,05$ ). Por sua vez, a atividade da amilase foi menor nos animais alimentados com 100 e 300 ppm de própolis bruta aos 21 dias de idade. Embora a literatura seja escassa com relação aos efeitos da inclusão de própolis na dieta sobre a atividade das enzimas, é possível relacionar à diminuição da amilase com sua complexa composição de polifenóis. Neste contexto, vários autores relatam que a atividade da amilase pode ser reduzida pelas antocianinas, ácidos fenólicos e flavonoides da dieta (McDougall et al., 2005; Hanhieva et al., 2010).

Tabela 6 – Atividade da lipase (UI/mg de proteína), amilase (UA/  $\mu$ g de proteína), tripsina (nmol/  $\mu$ g de proteína) e quimiotripsina (nmol/  $\mu$ g de proteína) de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Amilase	Tripsina	Quimiotripsina	Lipase
7 dias				
Controle	3,28±0,27	23,71±3,32	3,91±0,29	20,36±4,18
100 ppm	3,46±0,50	27,27±1,02	3,85±0,30	22,99±3,34
200 ppm	1,96±0,23	19,54±2,22	3,59±0,59	19,35±4,77
300 ppm	2,76±0,49	20,63±0,75	4,97±0,65	25,80±1,76
400 ppm	2,68±0,51	22,15±3,70	4,91±1,31	20,14±4,40
500 ppm	2,76±0,73	20,98±2,81	4,11±1,31	19,37±2,53
CV (%)	38,72	26,22	40,57	33,32
Regressão	ns	ns	ns	ns
21 dias				
Controle	5,72±0,54	36,22±6,52	5,24±0,77	23,35±3,76
100 ppm	2,91±1,12*	32,85±8,43	6,27±0,39	23,63±1,86
200 ppm	3,44±0,61	32,01±5,01	4,12±0,59	17,90±3,93
300 ppm	4,85±0,34	41,44±4,16	5,08±0,62	21,29±4,48
400 ppm	3,15±0,82*	32,47±3,48	4,83±0,59	21,94±3,43
500 ppm	5,28±0,81	30,19±6,34	4,73±1,43	14,06±1,96
CV (%)	40,23	32,89	27,87	33,75
Regressão	ns	ns	ns	ns

\*Significativo pelo teste de Dunnett ( $P>0,05$ )

ns = não significativo

De acordo com os resultados da morfofisiologia intestinal, pode-se observar que os efeitos da própolis ocorreram após os sete dias de idade. De fato, Wang et al. (2007) demonstraram que o pólen de abelha, que corresponde a 5% da própolis bruta (Warakomska & Maciejewicz, 1992) promove o desenvolvimento do intestino em frangos de corte principalmente após uma ou duas semanas de administração do ingrediente na dieta.

Assim, é provável que a inclusão da própolis bruta na dieta de crescimento, melhorasse o desempenho produtivo aos 42 dias, considerando que embora a suplementação no período de um a 21 dias de idade não tenha ocasionado melhorias no desempenho dos animais, houve aumento linear ( $P < 0,05$ ) no rendimento de carcaça aos 42 dias de idade. Quando comparado cada nível de inclusão da própolis bruta com o tratamento controle não foi encontrada diferença ( $P > 0,05$ ). Os rendimentos de cortes (peito, perna e asa) não foram alterados ( $P > 0,05$ ) pelos níveis de própolis bruta (Tabela 7).

Tabela 7 - Rendimento de carcaça (%) e de cortes (%) ( $\pm$  erro padrão) de frangos abatidos aos 42 dias de idade, alimentados até os 21 dias com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Carcaça	Peito	Perna	Asa	Gordura
Controle	71,55 $\pm$ 0,31	35,57 $\pm$ 0,21	30,27 $\pm$ 0,16	11,64 $\pm$ 0,21	2,19 $\pm$ 0,08
100 ppm	71,07 $\pm$ 0,47	35,90 $\pm$ 0,54	30,96 $\pm$ 0,44	11,61 $\pm$ 0,16	1,90 $\pm$ 0,19
200 ppm	71,16 $\pm$ 0,49	35,81 $\pm$ 0,26	30,18 $\pm$ 0,34	11,52 $\pm$ 0,09	2,34 $\pm$ 0,20
300ppm	70,84 $\pm$ 0,32	35,76 $\pm$ 0,41	30,19 $\pm$ 0,51	11,69 $\pm$ 0,15	2,26 $\pm$ 0,22
400 ppm	71,64 $\pm$ 0,32	36,58 $\pm$ 0,28	30,13 $\pm$ 0,32	11,86 $\pm$ 0,11	2,41 $\pm$ 0,08
500 ppm	72,31 $\pm$ 0,46	35,99 $\pm$ 0,59	29,79 $\pm$ 0,65	11,55 $\pm$ 0,11	2,31 $\pm$ 0,06
CV (%)	1,26	2,55	3,19	2,74	15,27
Regressão	Linear <sup>1</sup>	ns	ns	ns	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P > 0,05$ )

ns = não significativo

<sup>1</sup>  $Y = 70,5171 + 0,00295521x$  ( $R^2 = 0,64$ ); ( $P = 0,04$ )

O resultado positivo quanto ao rendimento de carcaça se destaca pela grande maioria dos trabalhos que utilizaram diferentes aditivos naturais nas rações de frangos de corte não terem observado melhorias na avaliação das carcaças (Batista et al., 2007; Tekeli et al., 2011).

Não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) dos diferentes níveis de inclusão da própolis bruta sobre os lipídeos sanguíneos, no entanto, os tratamentos com 400 e 500 ppm de própolis bruta apresentaram maiores valores ( $P < 0,05$ ) para colesterol total quando comparados ao tratamento controle. As enzimas hepáticas AST e ALT não diferiram ( $P > 0,05$ ) aos 21 dias de idade para os animais alimentados com própolis bruta.



Tabela 8 - Colesterol total (mg dL-1), triglicérides (mg dL-1), alanina aminotransferase (ALT) (U/I) e aspartato aminotransferase (AST) (U/I) ( $\pm$  erro padrão) de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Colesterol Total	Triglicérides	ALT	AST
Controle	108,23 $\pm$ 3,20	123,23 $\pm$ 11,35	3,14 $\pm$ 0,65	154,18 $\pm$ 3,87
100 ppm	127,02 $\pm$ 13,45	108,23 $\pm$ 9,70	3,49 $\pm$ 0,00	166,09 $\pm$ 15,80
200 ppm	117,77 $\pm$ 13,14	100,32 $\pm$ 11,40	2,44 $\pm$ 0,43	160,65 $\pm$ 7,61
300 ppm	125,91 $\pm$ 6,78	107,89 $\pm$ 6,53	2,18 $\pm$ 0,44	180,28 $\pm$ 18,18
400 ppm	148,10 $\pm$ 6,72*	115,33 $\pm$ 14,96	3,49 $\pm$ 0,00	177,44 $\pm$ 21,37
500 ppm	145,84 $\pm$ 9,72*	111,42 $\pm$ 5,45	3,14 $\pm$ 0,65	200,56 $\pm$ 29,60
CV (%)	16,63	21,77	35,19	22,35
Regressão	ns	ns	ns	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P > 0,05$ )

ns = não significativo

Diferentes aditivos naturais apresentam resultados controversos quanto à influência sobre os parâmetros lipídicos, alguns autores reportaram reduções nos valores, no entanto, outros não observaram modificações (Jin et al., 1998; Denli et al., 2005; Manzoni et al., 2008; Tekeli et al., 2011). Não se sabe ao certo como a inclusão da própolis bruta pode ter influenciado o aumento dos níveis séricos de colesterol, deixando evidente que o modo de ação deste ingrediente ainda não está completamente elucidado.

Estudos relatam que os compostos da própolis apresentam funções hepatoprotetoras (González et al., 1995). Para determinação de possíveis lesões hepáticas são utilizados marcadores bioquímicos como as enzimas AST e ALT. Elevações nas concentrações plasmáticas podem indicar disfunções decorrentes de lesões nos hepatócitos ou por alterações na permeabilidade da membrana (Oliveira et al., 2005). Os resultados obtidos sugerem que não houve influência da própolis bruta sobre os parâmetros enzimáticos, apesar dos valores se encontrarem abaixo dos reportados por Borsa et al (2006).

### Conclusão

Os níveis de própolis bruta, estudados neste trabalho, não influenciaram os parâmetros de desempenho, apesar dos benefícios quanto ao rendimento de carcaça e morfofisiologia intestinal.

### Referências

- ALMEIDA, EC; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.8, n.2, p. 191-212, 2002.
- AWAD, WA; GHAREEB, K; ABDEL-RAHEEM, S et al. Effects of dietary inclusion of probiótico and symbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. **Poultry Science**, v.88, p. 49-55, 2009.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.2, n.1, p. 29-32, 2005.
- BANKOVA, VS; CASTRO, SL; MARCUCCI, MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.
- BATISTA, LS; GARCIA, EA; FAITARONE, ABG et al. Flavonoids and mannanoligosaccharides in broiler diets. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.9, n.1, p. 33-37, 2007.
- BORSA, A; KOHAYAGAWA, A; BORETTI, LP et al. Níveis séricos de enzimas de função hepática em frangos de corte de criação industrial clinicamente saudáveis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.4, p. 675-677, 2006.
- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive for the quantification of microgram quantities of protein utilizind the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p. 248-254, 1976.
- Brasil Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº3 – Anexo VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.
- BURDOCK, GA. Review of the biological properties and toxicity of bee própolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 347-363, 1998.
- CUNHA, IBS; SAWAYA, ACHF, CAETANO, FM et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 6, p. 964-970, 2004.
- DAHLQUIST, A. Method for assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v.7, p. 447-454, 1964.
- DENLI, M; CANKAYA, S; SILICI, S et al. Effect of dietary addition of Turkish propolis on the growth performance, carcass characteristics and serum variables of quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Animal Science**, v. 18, n. 6, p. 848-854, 2005.
- DIMOV, V; IVANOVSKA, N; MANOLOVA, N et al. Immunomodulatory action of própolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage. **Apidologie**, v.22, p. 155-162, 1991.
- ERLANGER, BF; EDEL, F; COOPER, AG. The action of chymotrypsin on two new chromogenic substrates. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v.115, p. 206-210, 1966.
- FU, S; YANG, M; WEN, H et al. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.13, n.1, p. 43-50, 2005.
- FUNARI, CS; FERRO, VO. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p. 171-178, 2006.
- GONZÁLEZ, R; CORCHO, I; REMIREZ, D et al. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytotherapy Research*, v.9, p.114-117, 1995.
- GRANGE, JM; DAVEY, RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.159-160, 1990.

- HANHINEVA, K; TÖRRÖNEN, R; BONDIA-PONS, I et al. Impact of dietary polyphenols on carbohydrate metabolism. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1365-1402, 2010.
- HAYASHI, K; KOMURA, S; ISAJI, N et al. Isolation of antioxidative compounds from brazilian propolis: 3,4-dihydroxy-5-prenylcinnamic acid, a novel potent antioxidant. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.47, n.11, p. 1521-1524, 1999.
- JAMROZ, D; WERTELEKI, T; HOUSZKA, M et al. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.90, p. 255-268, 2006.
- JIN, LZ; HO, YW; ABDULLAH, N et al. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing *Lactobacillus* cultures. **Poultry Science**, v.77, p. 1259-1265, 1998.
- KAKADE, ML; RACKIS, JJ; MCGHEE, JG. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products. A collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, v.51, p. 376-382, 1974.
- 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. 235-240, 1999.
- LUNA, GC. **Manual of histologic staining methods of the armed forces**. Institut of pathology. 3.ed. New York: Mc Graw-Hill, p. 285, 1968.
- MAC DONAL, O; CHEDIACK, JG; CAVIEDES-VIDAL, E. Isolation of epithelial cells, villi and crypts from small intestine of pigeons (*Columba livia*). **Biocell**, v. 32, n.3, p. 219-227, 2008.
- MANZONI, MSJ; CAVALLINI, DCU; ROSSI, EA. Efeitos do consumo de probióticos nos lípidos sanguíneos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.3, p.351-360, 2008.
- McDOUGALL; GJ; SHPIRO, F; DOBSON, P et al. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit alpha-amylase and alpha-glucosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 2760–2766, 2005.
- MILES, RD; BUTCHER, GD; HENRY, PR et al. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. **Poultry Science**, v.85, p. 476-485, 2006.
- MISSIMA, F; SFORCIN, JM. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.5, n.1, p. 71-75, 2008.
- OLIVEIRA, TT; NAGEM, TJ; RIBEIRO, JN. Análise sérica das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e gama glutamiltranspeptidase de coelhos adultos tratados com extrato bruto de própolis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.26, n.1, p. 25-28, 2005.
- PELICANO, ERL; SOUZA, PA; SOUZA, HBA et al. Performance of broilers fed diets containing natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.6, n.4, p. 231-236, 2004.
- PELICANO, ERL; SOUZA, PA; SOUZA, HBA et al. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.7, n.4, p. 221-229, 2005.
- PIERPOINT, WS. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v.244, p. 65-74, 2004.

- RAHMANI, HR; SPEER, W. Natural additives influence the performance and humoral immunity of broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.9, p. 713-717, 2005.
- ROSTAGNO, HS; ALBINO, LFT; DONZELE, JL et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186p.
- SALATINO, A; TEIXEIRA, EW; NEGRI, G et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (eCAM)**, v.2, n.1, p. 33-38, 2005.
- SAYRAFI, R; SOLTANALINEJAD, F; SHAHROOZ, R et al. Comparative study of the effect of alternative and antibiotic feed additives on the performance and intestinal histomorphometrical parameters of broiler chickens. **African Journal of Agricultural Research**, v.6, n.12, p. 2794-2799, 2011.
- SHALMANY, SK; SHIVAZAD, M. The effect of diet propolis supplementation on ross broiler chicks performance. **International Journal of Poultry Science**, v.5, n.1, p. 84-88, 2006.
- SINGLETON, VL; ROSSI Jr, JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p. 144-158, 1965.
- TATLI SEVEN, PT; SEVEN, I; YILMAZ, M. The effects of Turkish propolis on growth and carcass characteristics in broilers under heat stress. **Animal Feed Science and Technology**, v. 146, p. 137-148, 2008.
- TEKELI, A; KUTLU, HR; ÇELIK, L et al. Determination of the effects of *Z. officinale* and propolis extracts on intestinal microbiology and histological characteristics in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.9, p. 898-906, 2010.
- TEKELI, A; KUTLU, HR; ÇELIK, L. Effects of *Z. officinale* and propolis extracts on the performance carcass and some blood parameters of broiler chicks. **Current Research in Poultry Science**, v.1, n.1, p. 12-23, 2011.
- VIVEROS, A; CHAMORRO, S; PIZARRO, M et al. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. **Poultry Science**, v.90, p. 566-578, 2011.
- WANG, J; LI, S; WANG, Q et al. Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. **Journal of Medicinal Food**, v.10, n.2, p. 276-280, 2007.
- WARAKOMSKA, Z; MACIEJEWICZ, W. Microscopic analysis of propolis from Polish regions. **Apidologie**, v.23, p. 277-283, 1992.
- WINDISCH, W; SCHEDLE, K; PLITZNER, C et al. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, v.86 (E-suppl.), p. E140-E148, 2008.
- ZIARAN, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Effect of dietary oil extract of propolis on immune response and broiler response. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.10, p. 1485-1490, 2005.

## **V – Extrato etanólico de própolis como agente imunoestimulante na alimentação de frangos de corte na fase inicial**

**Resumo** – O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da suplementação de extrato etanólico de própolis (EEP) nas dietas de frangos de corte sobre as respostas imunes (humoral e celular), peso de órgãos linfoides e perfil hematológico. Foram utilizados 192 pintos de corte, machos, criados em gaiolas de metabolismo até os 21 dias de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão de EEP (0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm), oito repetições e quatro aves por unidade experimental. A inclusão dietética de EEP proporcionou comportamento quadrático ( $P < 0,05$ ) para peso relativo do baço e bolsa cloacal, com os menores pesos encontrados ao nível de 2946 ppm e 2985 ppm de EEP, respectivamente. Para o peso relativo do timo não foi observada influência ( $P > 0,05$ ) dos tratamentos. A inclusão de EEP não alterou ( $P > 0,05$ ) a porcentagem de linfócito, heterófilo, basófilo, eosinófilo e a relação heterófilo:linfócito. No entanto, observou-se redução ( $P < 0,05$ ) com relação à porcentagem de monócito para o nível de inclusão de 3000 ppm de EEP quando comparado ao tratamento controle. Os parâmetros de atividade fagocítica dos macrófagos, número médio de hemácias fagocitadas e produção de óxido nítrico não foram alterados ( $P > 0,05$ ). A reação interdigital a fitohemaglutinina apresentou comportamento linear negativo e quadrático ( $P < 0,05$ ) em função do tempo e dos níveis de inclusão, respectivamente, observando o menor valor da reação com o nível de 3074 ppm de EEP. As aves apresentaram aumento linear ( $P < 0,05$ ) dos anticorpos séricos contra a doença de Newcastle. O EEP mostrou efeito imunoestimulante capaz de proporcionar melhor resposta imune humoral.

**Palavras-chave:** anticorpo, macrófagos, resposta imune humoral, resposta imune celular, sistema imune

## **V – Ethanolic extract of propolis as immunostimulant agent in broiler chickens diets**

**Abstract** – The present study aimed to evaluate the effect of different levels of ethanolic extract of propolis (EEP) in broiler chickens diets on immune responses (humoral and cellular), weight of lymphoid organs and hematological profile. A total of 192 birds, raised in metabolism cages until the 21<sup>st</sup> day were distributed in a completely randomised design to six treatments (EEP supplement levels of 0, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 ppm) and eight replications and four birds per experimental unit. The inclusion of EEP gave a quadratic effect ( $P < 0.05$ ) for relative weight of spleen and cloacal bursa, with the lowest weights found at the level of 2946 ppm and 2985 ppm of EEP, respectively. For the relative weight of the thymus no change was observed ( $P > 0.05$ ). There was no change ( $P > 0.05$ ) in percentages of lymphocyte, heterophil, basophil, eosinophil and heterophil:lymphocyte ratio with the inclusion of EEP. However, there was a reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of monocyte to the inclusion level of 3000 ppm of EEP when compared to control. The phagocytic activity of the macrophages, the average number of the phagocytized red cells and nitric oxide production were not affected ( $P > 0.05$ ). The interdigital response to phytohemagglutinin showed negative linear and quadratic behavior ( $P < 0.05$ ) as a function of time and levels of inclusion, respectively, being the smallest value of the reaction with the level of 3074 ppm of EEP. The birds showed a linear increase ( $P < 0.05$ ) of serum antibodies against Newcastle disease. The EEP showed immunostimulant effect able to provide better humoral immune response.

**Key words:** antibody, cellular immune response, immune system, humoral immune response, macrophages

### Introdução

Os intensivos sistemas de produção avícola, responsáveis pelas expressivas estatísticas econômicas do setor, tiveram por muitos anos os quimioterápicos como aliado, utilizados no controle de agentes patogênicos presentes no trato gastrointestinal, garantindo ótima performance produtiva dos animais. No entanto, a proibição do uso dos antibióticos pode aumentar a susceptibilidade dos animais a doenças, frente aos desafios sanitários, resultando em impacto negativo sobre o setor (Toledo et al., 2007).

Como consequência, alternativas para amenizar as perdas econômicas são estudadas constantemente. Atualmente, atenção especial é dada a própolis, produto produzido pelas abelhas melíferas pelo processamento de resinas e bálsamos retirados de plantas, cera e secreções salivares (Barth et al., 1999), rica em constituintes bioquímicos como polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos, aldeídos aromáticos, ésteres, aminoácidos, minerais e vitaminas (Park et al., 2002).

Estes compostos são capazes de potencializar elementos do sistema imunológico (Fischer et al., 2008), aumentando a resistência a doenças e reduzindo a perda de desempenho (Ziaran et al., 2005). As melhorias sobre as funções imunes, humoral e celular, ocorrem pela influência na ativação de macrófagos, síntese de anticorpos, atividade dos linfócitos *natural killer*, aumento no peso dos órgãos linfoides, entre outras (Orsi et al., 2000; Taheri et al., 2005; Fischer et al., 2008; Çetin et al., 2010).

Além desta interferência direta, os compostos podem atuar indiretamente sobre o sistema imunológico pelo fato de possuírem diversas outras atividades biológicas, como antioxidante, anti-inflamatória e principalmente antimicrobiana (Fernandes Jr et al., 2006; Lustosa et al., 2008; Cabral et al., 2009).

Neste contexto, através da ação antimicrobiana, a própolis pode modular a microbiota intestinal, e através deste modo de ação, estimular e regular vários aspectos do sistema imune (Haghighi et al., 2005; Fonseca & Costa, 2010), sendo responsável pela maturação do mesmo (Chung & Kasper, 2010). Reporta-se que uma rápida colonização bacteriana após o nascimento está associada à produção de anticorpos pelo organismo (Suzuki et al., 2007).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da suplementação de extrato etanólico de própolis nas dietas de frangos de corte sobre as respostas imunes (humoral e celular), peso de órgãos linfoides e perfil hematológico.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Para o ensaio foram utilizadas 192 aves de corte de um dia de idade, machos, linhagem Cobb-Vantress, criadas em gaiolas de metabolismo até aos 21 dias de idade. As gaiolas foram posicionadas dentro de um galpão convencional, com cobertura de telha fibrocimento, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 metros de altura.

Durante os primeiros cinco dias de vida, os pisos das gaiolas foram forrados com papel kraft e trocados diariamente. As gaiolas foram equipadas com comedouros de cano de PVC e bebedouros tipo copo de pressão, os quais foram substituídos gradativamente por bebedouros automáticos tipo copo. Para o aquecimento inicial dos pintos foram utilizadas lâmpadas infravermelhas dispostas em um suporte de madeira posicionado na parte traseira das gaiolas.

As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas diariamente dentro do galpão, foram respectivamente, de 22°C e 29°C e a umidade relativa média de 56%.

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente ao acaso com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão do extrato etanólico de própolis (EEP) (0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm) nas rações, com oito repetições e quatro aves por unidade experimental. O tratamento controle (0 ppm) não continha qualquer tipo de aditivo. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 048/2010).

O EEP, composto por 50% de própolis e 50% de álcool etílico, foi adquirido em Maringá-PR e conservado em temperatura entre 2-8°C até o momento de utilização. A composição do extrato foi determinada de acordo com Singleton & Rossi (1965) e Pierpoint (2004) para polifenóis totais e utilizando o método colorimétrico cloreto de alumínio para o conteúdo de flavonoides totais.

As dietas experimentais foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005), para as fases de um a sete e oito a 21 dias de idade (Tabela 1).



Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Fases (dias)	
	1 a 7	8 a 21
Milho	55,75	58,63
Farelo de Soja, 45%	37,04	34,39
Óleo de Soja	2,20	2,51
Calcário	0,92	0,88
Fosfato Bicálcico	1,94	1,80
Sal	0,40	0,40
Inerte*	0,50	0,50
DL- Metionina, 98%	0,36	0,24
L- Lisina HCl, 78%	0,35	0,19
L- Treonina, 98%	0,15	0,05
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	0,40	0,40
Total	100	100
Valores calculados		
PB (%)	22,04	20,79
EMA (kcal/kg)	2,950	3,000
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442
Met + Cis, dig (%)	0,944	0,814
Lisina, dig (%)	1,330	1,146
Treonina, dig (%)	0,865	0,745
Triptofano, dig (%)	0,213	0,183

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.916.670 UI/kg; Vit. D3 583.330 UI/kg; Vit. E 8.750 UI/kg; Vit. K3 433.33 mg/kg; Vit. B1 408.33 mg/kg; Vit. B2 1.333,33 mg/kg, Vit. B12 4.166,67 mcg/kg; Niacina 8.983,33 mg/kg; Pantotenato de cálcio 3.166,67 mg/kg; Ácido Fólico 200 mg/kg; Biotina 25 mg/kg. Suplemento Mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.6 g/kg; Cobre 3.072 mg/kg; Iodo 248 mg/kg; Zinco 12.6 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 61.20 mg/kg; Cobalto 50.40 mg/kg.

\* O extrato etanólico de própolis foi adicionado as rações em substituição ao inerte.

As aves foram vacinadas contra a doença de Newcastle no 14º dia de vida e aos 21 dias foi feita a colheita de amostras de sangue por punção da veia jugular de seis aves por tratamento selecionadas aleatoriamente. O sangue foi dessorado e o soro reservado para mensuração da produção de anticorpos contra a doença de Newcastle, testados através do ELISA indireto (IDEXX<sup>®</sup>) de acordo com instruções do fabricante. Os títulos avaliados foram referentes à resposta vacinal.

Aos 21 dias de idade, seis aves de cada tratamento, com peso representativo (média±5%), foram selecionadas aleatoriamente para determinação do perfil hematológico e do peso relativo (% do peso vivo) dos órgãos linfoides (bolsa cloacal, timo e baço).

Para a determinação do perfil hematológico, preparou-se um esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro, que foi corado pelo método de May Grunwald – Giemsa. A contagem diferencial realizada em microscópio ótico com objetiva de imersão foi

classificatória para linfócitos, heterófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos, calculando a proporção de cada em cem células contadas/ave.

Seis aves de cada tratamento também foram selecionadas ao acaso aos 21 dias de idade para avaliação da resposta imune mediada por células *in vivo*, segundo o protocolo descrito por Carrier & DeLoach (1990). Foram injetados intradermicamente, entre a terceira e a quarta prega interdigital do pé direito, 0,1 mL de fitohemaglutinina PHA-M<sup>®</sup> (Invitrogen). O mesmo volume de solução salina foi aplicado no pé esquerdo, como controle negativo. O espessamento da pele, em ambos os pés foi mensurado, com auxílio de um paquímetro digital, antes da inoculação e 12, 24, 48 e 72 horas após. Os resultados foram obtidos pela diferença entre a resposta a fitohemaglutinina e a resposta do controle, nos diferentes tempos.

Para avaliação da atividade fagocítica de macrófagos abdominais, segundo protocolo de Qureshi et al. (1986), foram utilizadas cinco aves aleatoriamente por tratamento. Aos 21 dias de idade foi injetado na cavidade peritoneal um mL para cada 100g de peso corpóreo de solução de Sephadex G-50<sup>®</sup> (Sigma) a 3% em solução salina 0,9%.

Após 42 horas, as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e realizado o processo de limpeza (detergente neutro) e sanitização (álcool 70%) do abdômen com posterior inoculação de 20 mL de PBS estéril heparinizado (0,5 U/mL Liquevine<sup>®</sup> - Roche), sendo coletado aproximadamente 15 mL deste líquido abdominal, imediatamente acondicionado em tubos plásticos mantidos em gelo. O material coletado foi centrifugado a 1500rpm/10 minutos, sendo o pellet ressuspendido em um mL de meio RPMI 1640<sup>®</sup> (Sigma). Adicionou-se 150µL dessa suspensão a cada poço da placa de cultura, contendo lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro e após uma hora de incubação em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, lavou-se cada poço com solução RPMI 1640, para remover as células não aderidas. Em seguida, adicionou-se 200µL de eritrócitos de carneiros (suspensão de 3% de hemácias em meio RPMI 1640) incubando novamente por uma hora. Após o tempo final de incubação lavou-se cada poço com meio RPMI 1640 e procedeu-se com o processo de coloração, utilizando kit comercial (Panótico Rápido LB<sup>®</sup> - Laborclin).

Após o processo de secagem e fixação das lamínulas em lâminas de vidro, procedeu-se a contagem de 200 macrófagos em duplicata por ave, verificando o número de macrófagos que continham eritrócitos fagocitados e o número de eritrócitos em cada

macrófago. A atividade fagocítica foi calculada considerando o número de macrófagos contendo eritrócitos fagocitados dividido pelo número total de macrófagos contados.

Concomitantemente, foi realizado este mesmo processo com uma segunda placa, sendo que após a segunda lavagem foi mantido em cada poço 200µL de meio RPMI 1640 e colocada em estufa por adicionais 24 horas para dosagem da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos. Cada amostra continha um controle positivo (MØ + hc) e negativo (MØ), que diferenciava quanto à presença ou não de hemácias, sendo que o negativo seria a produção espontânea de óxido nítrico pelos macrófagos. Após o período de 24 horas o líquido foi coletado e a dosagem de nitritos foi realizada por meio da reação de Griess (Qureshi et al., 1986).

Os dados de peso relativo dos órgãos linfoides, atividade de macrófagos e título de anticorpo foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial por meio do programa SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 1997).

Para os dados hematológicos primeiramente foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância e regressão linear simples, enquanto as demais foram analisadas por meio da metodologia de modelos lineares generalizados, utilizando distribuição Gama com função de ligação inversa. Para a reação interdigital a fitohemaglutinina também foi realizado teste de Shapiro-Wilk e as variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância e regressão linear múltipla, considerando o tempo e os níveis de inclusão do EEP, sendo os resultados apresentados através de gráfico de superfície de resposta. Ambas as análises foram realizadas por meio do programa R (*R Development Core Team, 2009*).

Para comparação de resultados entre o controle e os níveis de inclusão de EEP foi utilizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade. No caso da reação interdigital a fitohemaglutinina com relação ao efeito do tempo em que decorreu entre uma medida e outra foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Resultados e Discussões**

A concentração de polifenóis e flavonoides totais encontrada no EEP foi de 357,71 mg/L e 112,72 mg/L, respectivamente. Valores estes superiores aos normalmente encontrados nos extratos (Silva et al., 2006; Sousa, et al., 2007; Buriol et al., 2009). O grupo dos flavonoides é considerado papel chave nas atividades biológicas

pela alta concentração (Fu et al., 2005), sendo que a presença deste composto é utilizada como parâmetro de qualidade da própolis bruta como de seus produtos.

A inclusão dietética de EEP proporcionou um efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) para peso relativo do baço e bolsa cloacal aos 21 dias de idade, sendo o menor valor encontrado ao nível de 2946 ppm e 2985 ppm, respectivamente. No entanto, quando comparado cada nível de inclusão de EEP com o controle (0 ppm) não foi detectado diferença ( $P > 0,05$ ). Para o peso relativo do timo não foi observado influência ( $P > 0,05$ ) dos níveis de EEP (Tabela 2).

O peso relativo dos órgãos linfoides é um parâmetro para prever o *status* imunitário do animal (Chichlowski et al., 2007; Ashayerizadeh et al., 2009). A bolsa cloacal é responsável pela maturação dos linfócitos B e desta forma, o peso relativo do órgão não deve ser considerado isoladamente, devendo correlacionar com a produção de anticorpos pelo organismo (Kabir et al., 2004). Com relação ao baço, considerado um órgão linfóide secundário, segundo Ribeiro et al. (2008) alterações em seu peso não são indicativos específicos do perfil imunológico do animal.

Tabela 2 – Peso relativo (%)  $\pm$  erro padrão do timo, baço e bolsa cloacal de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Timo	Bolsa Cloacal	Baço
Controle	0,415 $\pm$ 0,04	0,229 $\pm$ 0,01	0,128 $\pm$ 0,01
1000 ppm	0,380 $\pm$ 0,04	0,280 $\pm$ 0,03	0,146 $\pm$ 0,01
2000 ppm	0,525 $\pm$ 0,04	0,226 $\pm$ 0,01	0,121 $\pm$ 0,01
3000 ppm	0,432 $\pm$ 0,03	0,199 $\pm$ 0,02	0,116 $\pm$ 0,01
4000 ppm	0,395 $\pm$ 0,02	0,242 $\pm$ 0,02	0,134 $\pm$ 0,01
5000 ppm	0,453 $\pm$ 0,02	0,275 $\pm$ 0,02	0,142 $\pm$ 0,01
CV (%)	18,49	19,99	18,33
Regressão	ns	Quadrática <sup>1</sup>	Quadrática <sup>2</sup>

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P > 0,05$ )

ns = não significativo

<sup>1</sup>  $Y = 0,364969 - 1,04227x + 1,74600x^2$  ( $R^2 = 0,92$ ); ( $P = 0,004$ ); Ponto de mínima: 2985 ppm

<sup>2</sup>  $Y = 0,173797 - 0,000037413x + 0,0000000635x^2$  ( $R^2 = 0,84$ ); ( $P = 0,03$ ); Ponto de mínima: 2946 ppm

A inclusão do extrato não influenciou ( $P > 0,05$ ) as contagens de linfócito, heterófilo, basófilo, eosinófilo e a relação heterófilo:linfócito. No entanto, observou-se redução ( $P < 0,05$ ) com relação à porcentagem de monócito para o nível de inclusão de 3000 ppm de EEP quando comparado ao tratamento controle (Tabela 3).

A contagem diferencial dos componentes celulares é um dado complementar para avaliar as respostas imunológicas dos animais (Cardoso & Tessari, 2003), sendo

indicadora da influência da nutrição e suplementação de aditivos nas dietas sobre o organismo animal (Toghyani et al., 2010). Como a alteração foi observada somente para os monócitos, não existe evidência suficiente para inferir que a inclusão do EEP possa ter alterado os parâmetros hematológicos das aves. Da mesma forma, Shahryar et al. (2011), trabalhando com EEP, observaram tendência redutiva quanto a porcentagem de monócitos conforme aumento dos níveis de inclusão.

Resultados controversos são encontrados na literatura quanto à influência de EEP sobre os parâmetros hematológicos. Diversos autores reportam melhorias quanto a imunidade pelo aumento dos linfócitos e redução dos heterófilos (Ziaran et al., 2005; Abd El-Motaal et al., 2008; Galal et al., 2008a; Galal et al., 2008b) e nenhuma modificação na contagem diferencial das células (Çetin et al., 2010).

A porcentagem encontrada para linfócito e heterófilo está de acordo com os citados na literatura, no entanto, para eosinófilo e basófilo os valores encontrados estão acima dos valores de referência publicados e para os monócitos estão abaixo (Cardoso & Tessari, 2003; Laganá et al., 2005). Diversos fatores podem interferir no perfil hematológico como, alimentação, linhagem, temperatura, *status* sanitário, dentre outros, o que justificaria as diferenças encontradas (Borsa, 2009).

Tabela 3 – Valores hematológicos (%) e a relação heterófilo:linfócito (H:L)  $\pm$  erro padrão de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Linfócito	Heterófilo	Basófilo	Monócito	Eosinófilo	Relação H:L
Controle	56,80 $\pm$ 0,98	26,94 $\pm$ 2,32	7,90 $\pm$ 2,32	1,72 $\pm$ 0,45	6,64 $\pm$ 1,57	0,48 $\pm$ 0,04
1000 ppm	67,08 $\pm$ 1,08	20,48 $\pm$ 2,85	7,34 $\pm$ 1,18	1,93 $\pm$ 1,18	3,18 $\pm$ 0,82	0,31 $\pm$ 0,04
2000 ppm	58,89 $\pm$ 1,28	27,84 $\pm$ 1,67	6,02 $\pm$ 1,85	0,95 $\pm$ 0,03	6,49 $\pm$ 0,51	0,47 $\pm$ 0,03
3000 ppm	61,60 $\pm$ 3,12	25,85 $\pm$ 3,55	6,67 $\pm$ 0,96	0,00 $\pm$ 0,00*	5,68 $\pm$ 0,56	0,44 $\pm$ 0,08
4000 ppm	58,12 $\pm$ 1,93	25,57 $\pm$ 1,55	10,26 $\pm$ 0,49	1,16 $\pm$ 0,37	4,88 $\pm$ 0,74	0,44 $\pm$ 0,04
5000 ppm	61,11 $\pm$ 2,66	27,12 $\pm$ 2,93	5,70 $\pm$ 0,84	0,98 $\pm$ 0,31	5,10 $\pm$ 0,82	0,45 $\pm$ 0,07
CV (%)	8,69	21,62	42,19	102,71	37,22	28,14
Regressão	ns	ns	ns	ns	ns	ns

\*Significativo pelo teste de Dunnett (P<0,05)

ns = não significativo

A inclusão de EEP nas rações não interferiu (P>0,05) na atividade fagocítica dos macrófagos, número médio de hemácias fagocitadas e produção de óxido nítrico de frangos de corte aos 21 dias de idade (Tabela 4).

Estudos têm demonstrado a influência dos compostos presentes na própolis sobre a ativação dos macrófagos (Dimov et al., 1991, Orsi et al., 2005) e modulação da produção de óxido nítrico por estas células (Missima & Sforcin, 2008; Araújo et al., 2010), sendo capazes de amplificar a resposta imune humoral (Ansorge et al., 2003). Os macrófagos são responsáveis por diversas funções no organismo animal como quimiotaxia, fagocitose, liberação de enzimas, participação como mediadores em processos inflamatórios, dentre outras (Qureshi, 1998; Sforcin, 2007; Fischer et al., 2008).

Estes efeitos benéficos parecem ser dose-dependente, podendo em altas concentrações inibir certos eventos imunológicos (Orsi et al., 2005). Desta forma, os níveis utilizados nos experimentos, aliado a maior concentração do extrato (50% de própolis e 50% de álcool etílico) podem ser os responsáveis pelos animais não expressarem melhores resultados.

Em certas ocasiões quando a atividade do sistema imune é modulada ocasiona benefícios ao organismo (Fischer et al., 2008). O óxido nítrico, relacionado com a atividade funcional dos macrófagos, é um importante neurotransmissor, vasodilatador (Chakraborty et al., 2006) e a atividade supressora da produção deste composto está relacionada a capacidade anti-inflamatória da própolis, evitando que o processo inflamatório se dissipe mais rapidamente (Ramos & Miranda, 2007).

Desta forma, por causa da complexidade química da própolis e dependendo da concentração dos compostos e o efeito sinérgico entre as substâncias, esta vem sendo descrita como imunoestimulante e imunossupressora (Fischer et al., 2008).

Tabela 4 – Atividade fagocítica (%), hemácias fagocitadas e concentração de óxido nítrico ( $\mu\text{m/mL}$ )  $\pm$  erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Atividade Fagocítica	Hemácias Fagocitadas	Óxido Nítrico	
			MØ + hc <sup>1</sup>	MØ <sup>2</sup>
Controle	25,36 $\pm$ 1,23	4,31 $\pm$ 0,09	16,70 $\pm$ 2,36	4,67 $\pm$ 1,21
1000 ppm	24,18 $\pm$ 3,88	4,56 $\pm$ 0,29	24,58 $\pm$ 5,50	8,06 $\pm$ 2,85
2000 ppm	21,97 $\pm$ 3,44	5,10 $\pm$ 0,21	14,88 $\pm$ 0,69	2,70 $\pm$ 0,05
3000 ppm	19,47 $\pm$ 1,50	5,00 $\pm$ 0,47	17,04 $\pm$ 3,09	5,99 $\pm$ 1,63
4000 ppm	24,15 $\pm$ 1,80	4,97 $\pm$ 0,11	21,20 $\pm$ 5,82	5,56 $\pm$ 1,90
5000 ppm	24,77 $\pm$ 0,52	4,80 $\pm$ 0,13	18,97 $\pm$ 1,52	5,70 $\pm$ 1,08
CV (%)	22,75	10,75	45,04	70,14
Regressão	ns	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Controle positivo = macrófagos + hemácias

<sup>2</sup> Controle negativo = macrófagos

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P > 0,05$ )

ns = não significativo

Para a resposta celular interdigital cutânea não foi observada interação ( $P > 0,05$ ) entre os fatores tratamento e tempo na reação. A análise de variância indicou que a variável sofreu apenas efeito do tempo ( $P < 0,05$ ) que decorreu entre uma medida e outra (Tabela 5). No entanto, a reação apresentou comportamento linear ( $P < 0,05$ ) em função do tempo e quadrático ( $P < 0,05$ ) em função dos níveis de tratamento. De acordo com a equação ajustada, o nível de 3074 ppm de EEP resultou no menor valor da reação (Figura 1).

O teste utilizando a fitohemaglutinina avalia a imunidade mediada por células, sendo a resposta linfócito-T dependente (Galal et al., 2008b). Os linfócitos são as células primárias responsáveis pela resposta imunológica adaptativa sendo necessária a interação de receptores da superfície celular e agentes estimulantes (Machado Júnior et al., 2006). Desta forma, a fitohemaglutinina apresenta capacidade mitogênica, sendo capaz de induzir o aumento da população de linfócitos, ocorrendo o acúmulo destas células e a infiltração de macrófagos 24 horas após o início da resposta cutânea (McCorkle et al., 1980).

Tabela 5 – Reação interdigital a fitohemaglutinina (mm)  $\pm$  erro padrão em frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	12h	24h	48h	72h	Média do tratamento
Controle	0,511 $\pm$ 0,10	0,497 $\pm$ 0,08	0,454 $\pm$ 0,11	0,347 $\pm$ 0,11	0,452
1000 ppm	0,648 $\pm$ 0,08	0,546 $\pm$ 0,14	0,568 $\pm$ 0,17	0,443 $\pm$ 0,16	0,551
2000 ppm	0,343 $\pm$ 0,06	0,478 $\pm$ 0,02	0,432 $\pm$ 0,05	0,304 $\pm$ 0,04	0,389
3000 ppm	0,493 $\pm$ 0,08	0,401 $\pm$ 0,08	0,420 $\pm$ 0,08	0,339 $\pm$ 0,07	0,413
4000 ppm	0,423 $\pm$ 0,09	0,455 $\pm$ 0,07	0,443 $\pm$ 0,07	0,312 $\pm$ 0,06	0,408
5000 ppm	0,589 $\pm$ 0,07	0,637 $\pm$ 0,10	0,450 $\pm$ 0,06	0,394 $\pm$ 0,08	0,518
Média do tempo	0,507a	0,507a	0,464ab	0,360b	
CV (%)	36,95	39,79	43,09	55,33	
Anova					
Tratamento	ns				
Tempo	*				
Regressão					
Tratamento x Tempo	ns				
Efeito de tempo	Linear <sup>1</sup> (P=0,006)				
Efeito de tratamento	Quadrático <sup>1</sup> (P=0,002)				

ns = não significativo

\*Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

<sup>1</sup>Y = 0,8273576 – 0,0024361\*hora -0,00022816680\*nível + 0,000000037106326\*nível<sup>2</sup> (R<sup>2</sup>=0,73)

Apesar de considerar que a máxima resposta ocorre após 24 horas, nota-se que os valores encontrados 12 e 24 horas são semelhantes, evidenciando uma resposta precoce independente do nível de inclusão de EEP, demonstrando que os animais apresentavam o sistema imune funcionalmente ativo. Da mesma forma, a reação inflamatória foi detectada mais precocemente, com três horas após a inoculação da fitohemaglutinina, por Ferreira et al., 2009. A redução da reação ao longo do tempo já era esperada em razão da regulação dos eventos fisiológicos com recrutamento das células que exercem suas funções combatendo agentes estranhos.



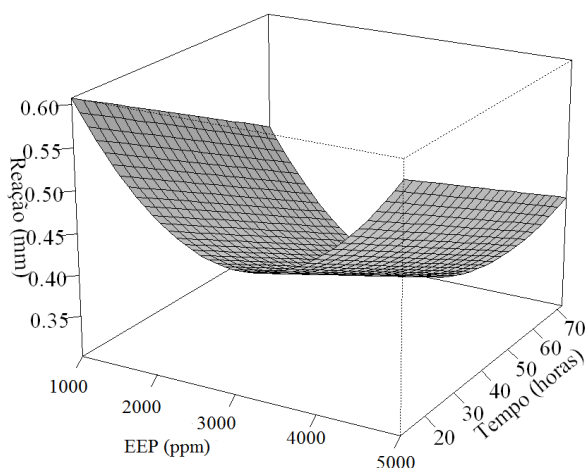


Figura 1. Superfície de resposta para a reação interdigital a fitohemaglutinina em função do nível de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP) e o tempo da análise em frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com rações contendo diferentes níveis de EEP.

Houve aumento linear ( $P < 0,05$ ) dos anticorpos séricos contra a doença de Newcastle aos 21 dias de idade, no entanto, quando comparado cada nível de inclusão de EEP com o tratamento controle, não foi detectado diferença ( $P > 0,05$ ) (Tabela 6).

Apesar dos níveis de EEP terem influenciado o peso relativo da bolsa cloacal, reduzindo-o até o nível de 2985 ppm e não terem alterado a atividade fagocítica dos macrófagos, evidenciou-se um efeito positivo sobre a imunidade humoral, ou seja, resposta imunológica realizada pelos anticorpos. A atividade adjuvante do EEP foi descrita anteriormente (Fischer et al., 2010) mostrando ser capaz de aumentar a resposta imunológica aos antígenos da vacina. Os compostos biologicamente ativos da própolis podem aumentar a produção de citocinas pelos macrófagos, estas moléculas estimulam a produção de linfócitos B que são modificadas a células plasmáticas, sendo possível a posterior produção de anticorpos (Taheri et al., 2005).

Além disso, reporta-se que em infecções virais primeiramente ocorre o aumento da porcentagem de linfócitos circulantes com posterior produção de anticorpos (Ziaran et al., 2005), entretanto, como as análises foram realizadas com frangos de mesma idade tal efeito não pode ser observado.

Tabela 6 – Título de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ )  $\pm$  erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de Inclusão de EEP	Título
Controle	2,535 $\pm$ 0,03
1000 ppm	2,448 $\pm$ 0,09
2000 ppm	2,375 $\pm$ 0,11
3000 ppm	2,438 $\pm$ 0,01
4000 ppm	2,663 $\pm$ 0,06
5000 ppm	2,625 $\pm$ 0,04
CV (%)	6,13
Regressão	Linear <sup>1</sup>

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P > 0,05$ )

ns = não significativo

<sup>1</sup>  $Y = 2,32002 + 0,0000641850x$  ( $R^2 = 0,66$ ); ( $P = 0,014$ )

O efeito imunoestimulante sobre a produção dos anticorpos também é demonstrado como sendo dose-dependente (Freitas et al., 2011). Cita-se como provável causa da inibição o sinergismo entre os componentes do extrato da própolis (Fischer et al., 2010). No entanto, tal efeito não foi confirmado, porque a produção de anticorpos aumentou conforme os níveis de inclusão do EEP.

Em adição, Kong et al. (2006) verificaram que somente 21 dias após a administração da vacina de Newcastle os animais apresentaram maiores títulos de anticorpos. Respostas positivas foram encontradas sete dias após a vacinação, sendo que, se a mensuração da produção de anticorpos tivesse sido realizada mais tardiamente poderiam ser observados maiores concentrações séricas de anticorpos com diferença entre os níveis de inclusão e o tratamento controle.

A intensidade da atuação dos compostos presentes na própolis sobre as respostas imunes (celular e humoral) depende do tipo e dosagem da própolis, composição química, frequência de administração das dietas experimentais, idade e peso do animal (Çetin et al., 2010), podendo ser estes fatores responsáveis pelos resultados divergentes encontrados entre trabalhos.

### Conclusão

A inclusão de extrato etanólico de própolis nas dietas de frangos de corte na fase inicial proporcionou melhor resposta imune humoral, com maior produção de anticorpos.

### Referências

- ABD EL-MOTAAL, AM; AHMED, AMH, BAHAKAIM, ASA et al. Productive performance and immunocompetence of commercial laying hens given diets supplemented with eucalyptus. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.5, p. 445-449, 2008.
- ANSORGE, S; REINHOLD, D; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- $\beta$ 1 production of human immune cells. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.58c, p. 580-589, 2003.
- ARAÚJO, MJAM; DUTRA, RP; COSTA, GC et al. Efeito do tratamento com própolis de *Scaptotrigona aff. postica* sobre o desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.4, p. 580-587, 2010.
- ASHAYERIZADEH, O; DASTAR, B; SHAMS SHARGH, M et al. Influence of antibiotic, prebiotic and probiotic supplementation to diets on carcass characteristics, hematological índices and internal organ size of young broiler chickens. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.9, p. 1772-1776, 2009.
- BARTH, OM; DUTRA, VML; JUSTO, RL. Análise polínica de algumas amostras de própolis do Brasil Meridional. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p. 663-667, 1999.
- BORSA, A. Valores hematológicos em frangos de corte de criação industrial. **Colloquium Agrariae**, v.5, n.1, p. 25-31, 2009.
- BURIOL, L; FINGER, D; SCHMIDT, EM et al. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v.32, n.2, p. 296-302, 2009.
- CABRAL, ISR; OLDONI, TLC; PRADO, A et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p. 1523-1527, 2009.
- CARDOSO, ALSP; TESSARI, ENC. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.4, p. 419-424, 2003.
- ÇETIN, E; SILICI, S; ÇETIN, N et al. Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. **Poultry Science**, v.89, p. 1703-1708, 2010.
- CHAKRABORTY, PD; BHATTACHARYYA, D; PAL, S et al. *In vitro* induction of nitric oxide by mouse peritoneal macrophages treated with human placental extracts. **International Immunopharmacology**, v.6, p. 100-107, 2006.
- CHICHLOWSKI, M; CROOM, J; McBRIDE, BW et al. Direct-fed microbial primalac and salinomycin modulate whole-body and intestinal oxygen consumption and intestinal mucosal cytokine production in the broiler chick. **Poultry Science**, v.86, p. 1100-1106, 2007.
- CHUNG, H; KASPER, DL. Microbiota-stimulated immune mechanisms to maintain gut homeostasis. **Current Opinion in Immunology**, v.22, p. 455-460, 2010.
- CORRIER, DE; DeLOACH, JR. Evaluation of cell-mediated, cutaneous basophil hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test. **Poultry Science**, v.69, p.403-408, 1990.
- DIMOV, V; IVANOVSKA, N; MANOLOVA, N et al. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v.22, p. 155-162, 1991.
- FERREIRA, SR; MURAKAMI, AE; SIQUEIRA, TGV et al. Níveis crescentes de parede de levedura sobre a resposta imune celular e perfil hematológico de frangos de corte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.9, p. 725-730, 2009.

- FERNANDES Jr, A; LOPES, MMR; COLOMBARI, V et al. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p. 294-297, 2006.
- FISCHER, G; HÜBNER, SO; VARGAS, GD et al. Imunomodulação pela própolis. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.2, p. 247-253, 2008.
- FISCHER, G; PAULINO, N; MARCUCCI, MC et al. Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.7, p. 908-913, 2010.
- FONSECA, FCP; COSTA, CL. Influência da nutrição sobre o sistema imune intestinal. **CERES: Nutrição & Saúde**, v.5, n.3, p. 99-110, 2010.
- FREITAS, JA; VANAT, N; PINHEIRO, JW et al. The effects of propolis on antibody production by laying hens. **Poultry Science**, v.90, p. 1227-1233, 2011.
- FU, S; YANG, M; WEN, H et al. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.13, n.1, p. 43-50, 2005.
- GALAL, A; AHMED, AMH; ALI, WAH et al. Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.3, p. 272-278, 2008a.
- GALAL, A; AHMED, AMH; ALI, WAH et al. Residual feed intake and its effect on cell-mediated immunity in laying hens given different propolis levels. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.11, p. 1105-1111, 2008b.
- HAGHIGHI, HR; GONG, J; GYLES, CL et al. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics in chickens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.12, p. 1387-1392, 2005.
- KABIR, SML; RAHMAN, MM; RAHMAN, MB et al. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.5, p. 361-364, 2004.
- KONG, XF; LU, YL; YIN, YL et al. Chinese herbal ingredients are effective immune stimulators for chickens infected with the Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v.85, p. 2169-2175, 2006.
- LAGANÁ, C; RIBEIRO, AML; GONZALEZ, FHD et al. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de frangos de corte em estresse por calor. **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.2, p. 157-165, 2005.
- LUSTOSA, SR; GALINDO, AB; NUNES, LCC et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p. 447-454, 2008.
- MACHADO JÚNIOR, JC; FLORÃO, A; MATTANA, FVR et al. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatória de extratos e substâncias isoladas de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 (Supl.), p. 645-655, 2006.
- McCORKLE, F; OLAH, I; GLICK, B. The morphology of the phytohemagglutinin-induced cell response in the chicken's wattle. **Poultry Science**, v.59, p. 616-623, 1980.
- MISSIMA, F; SFORCIN, JM. Green Brazilian propolis action on macrophages and lymphoid organs of chronically stressed mice. **Evidenced-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.5, n.1, p. 71-75, 2008.

- ORSI, RO; FUNARI, SRC; SOARES, AMVC et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, n.2, p. 205-219, 2000.
- ORSI, RO; SFORCIN, JM; FUNARI, SR et al. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v.5, n.2, p. 359-368, 2005.
- PARK, YK; ALENCAR, SM; SCAMPARINI, ARP et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v.32, n.6, p. 997-1003, 2002.
- PIERPOINT, WS. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v.244, p. 65-74, 2004.
- QURESHI, MA. Role of macrophages in avian health and disease. **Poultry Science**, v.77, p. 978-982, 1998.
- QURESHI, MA; DIETERI, RR; BACON, LD. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. *In: The Society for Experimental Biology and Medicine. Proceedings*, v.181, p. 560-568, 1986.
- RAMOS, AFN; MIRANDA, JL. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.13, n.4, p. 697-710, 2007.
- RIBEIRO, AML; VOGT, LK; CANAL, CW et al. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos e sua ação sobre a imunocompetência de frangos de corte submetidos a estresse por calor. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37,n.4, p. 636-644, 2008.
- ROSTAGNO, HS; ALBINO, LFT; DONZELE, JL et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186p.
- SFORCIN, JM. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 1-14, 2007.
- SHAHRYAR, HA; NAMVARI, M; NOUROLLAHI, H et al. Effect of alcoholic extract propolis on immune system in broiler chickens. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v.1, n.11, p. 20094-2097, 2011.
- SILVA, RA; RODRIGUES, AE; RIBEIRO, MCM et al. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.6, p. 1842-1848, 2006.
- SINGLETON, VL; ROSSI Jr, JA. Colorimetry of total phenolics whit phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p. 144-158, 1965.
- SOUSA, JPB; FURTADO, NAJC; JORGE, R et al. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p. 85-93, 2007.
- SUZUKI, S; SHIMOJO, N; TAJIRI, Y et al. Differences in the composition of intestinal *Bifidobacterium* species and the development of allergic diseases in infants in rural Japan. **Clinical & Experimental Allergy**, v.37, p. 506-511, 2007.
- TAHERI, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Humoral immunity of broilers is affected by oil extracted propolis (OEP) in the diet. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.6, p. 414-417, 2005.
- TOGHYANI, M; TOHIDI, M; GHEISARI, AA et al. Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as

- alternative for an antibiotic growth promoter. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.40, p. 6819-6825, 2010.
- TOLEDO, GSP; COSTA, PTC; SILVA, LP et al. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Ciência Rural**, v.37, n.6, p. 1760-1764, 2007.
- ZIARAN, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Effect of dietary oil extract of propolis on immune response and broiler performance. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.10, p. 1485-1490, 2005.

## **VI – Própolis bruta como agente imunoestimulante na alimentação de frangos de corte na fase inicial**

**Resumo** – O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da suplementação de própolis bruta nas dietas de frangos de corte sobre as respostas imunes (humoral e celular), peso dos órgãos linfoides e perfil hematológico. Foram utilizados 168 pintos de corte, machos, criados em gaiolas de metabolismo até aos 21 dias de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão da própolis (0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm), com sete repetições e quatro aves por unidade experimental. A inclusão de própolis bruta nas rações não afetou ( $P>0,05$ ) o peso relativo do timo, baço e bolsa cloacal e a produção dos anticorpos séricos contra a doença de Newcastle. Observou-se comportamento quadrático ( $P<0,05$ ) para a atividade fagocítica dos macrófagos em função dos níveis de própolis bruta, com menor atividade ao nível de 351 ppm. Além disso, quando comparado cada nível de inclusão com o controle observou-se que as aves que receberam rações contendo 100 ppm e 500 ppm de própolis bruta apresentaram maior atividade fagocítica ( $P<0,05$ ) e maior número de hemácias fagocitadas por macrófago ( $P<0,05$ ), respectivamente. Para a produção de óxido nítrico não foi observada alteração ( $P>0,05$ ). A reação interdigital a fitohemaglutinina apresentou comportamento quadrático em função do tempo e dos níveis de inclusão. De acordo com a equação ajustada, o nível de 275 ppm de própolis bruta e o tempo de 39,35 horas resultou no menor e maior valor da reação, respectivamente. A inclusão de própolis bruta nas rações de frangos de corte se mostrou eficaz como agente imunoestimulante nas respostas mediadas por células.

**Palavras-chave:** anticorpo, macrófagos, resposta imune humoral, resposta imune celular, sistema imune

## **VI – Crude propolis as immunostimulant agent in broiler chickens diets in the initial phase**

**Abstract** – The present study aimed to evaluate the supplementation efficiency of crude propolis in broiler chickens diets on immune responses (humoral and cellular), weight of lymphoid organs and hematological profile. A total of 168 birds, raised in metabolism cages until the 21<sup>st</sup> day, were distributed in a completely randomized design to six treatments (crude propolis supplement levels of 0, 100, 200, 300, 400 and 500 ppm) and seven replicates and four birds per experimental unit. The inclusion of crude propolis did not affect ( $P>0.05$ ) relative weight of lymphoid organs and the production of serum antibodies against Newcastle disease. There was a quadratic response ( $P<0.05$ ) for the phagocytic activity of macrophages, with lower activity level of 351 ppm. When each level of inclusion was compared to the control it was observed that the treatments containing 100 ppm and 500 ppm of crude propolis had higher phagocytic activity ( $P<0.05$ ) and higher number of phagocytized red cells ( $P<0.05$ ), respectively. The production of nitric oxide did not change ( $P>0.05$ ). The interdigital response to phytohemagglutinin showed a quadratic behavior ( $P<0.05$ ) in function of time and inclusion level. The level of 275 ppm of crude propolis and the time of 39.35 hours resulted in the lowest and highest reaction values. The inclusion of crude propolis in diets of broilers was effective as an immunostimulatory agent in cell-mediated responses.

**Key words:** antibody, cellular immune response, immune system, humoral immune response, macrophages



## Introdução

A expansão na avicultura foi acompanhada pelo uso rotineiro de quimioterápicos nas rações, combatendo agentes patogênicos presentes no organismo animal, reduzindo prejuízos no desempenho ocasionados por doenças clínicas e subclínicas (Dibner & Richards, 2005). No entanto, a pressão pública e científica frente a possíveis danos à saúde humana quando da utilização indiscriminada desses aditivos, tornou constante a busca por ingredientes naturais que possam substituí-los (Han et al., 2010).

Entre as alternativas estudadas, encontra-se a própolis, produto produzido pelas abelhas melíferas, que coletam resinas e bálsamos de diversas partes das plantas e reprocessam este material adicionando cera e secreções salivares (Daugusch et al., 2008). A própolis possui em sua composição química, compostos com diversas propriedades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória, antiviral e imunomodulatória, entre outras (Lofty, 2006).

Desta forma, essas substâncias, que incluem polifenóis, flavonoides, ácidos fenólicos, aldeídos aromáticos, ésteres, aminoácidos, minerais e vitaminas (Bankova et al., 2000; Trusheva et al., 2006), são capazes de interferir em diversas etapas do sistema imune, como o aumento da expressão das citocinas, envolvidas no desencadeamento das respostas imunitárias (Freitas et al., 2011), na produção de anticorpos (Ziaran et al., 2005; Galal et al., 2008a) e na atividade fagocítica dos macrófagos (Dimov et al., 1991, Sforcin, 2007).

A microbiota e o epitélio intestinal se inter-relacionam com o sistema imune. Os elementos bioativos da própolis possuem ações sobre a composição microbiana do trato gastrointestinal (Taheri et al., 2005) podendo aumentar e diversificar as respostas imunes (Haghighi et al., 2005). Em estudo, animais livres de germes demonstraram menor desenvolvimento do tecido linfóide associado à mucosa. Este tecido é responsável pelo fornecimento de células imunitárias e produtos na defesa contra agentes patogênicos (Janardhana et al., 2009).

Pouco se sabe a respeito do efeito da própolis *in natura* sobre as respostas imunitárias de frangos de corte, os estudos normalmente são realizados utilizando extrato etanólico ou oleoso de própolis. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da suplementação da própolis bruta nas dietas de frangos de corte sobre as respostas imunes (humoral e celular), peso de órgãos linfóides e perfil hematológico.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para o ensaio foram utilizadas 168 aves de corte de um dia de idade, machos, linhagem Cobb-Vantress, criadas em gaiolas de metabolismo até aos 21 dias de idade. As gaiolas foram posicionadas dentro de um galpão convencional, com cobertura de telha fibrocimento, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 metros de altura.

Durante os primeiros cinco dias de vida, os pisos das gaiolas foram forrados com papel kraft trocados diariamente. As gaiolas foram equipadas com comedouros de cano de PVC e bebedouros tipo copo de pressão, os quais foram substituídos gradativamente por bebedouros automáticos tipo copo. Para o aquecimento inicial dos pintos foram utilizadas lâmpadas infravermelhas dispostas em um suporte de madeira posicionado na parte traseira das gaiolas.

As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas diariamente dentro do galpão foram, respectivamente, de 26°C e 33°C e a umidade relativa média de 50%.

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente ao acaso com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão da própolis bruta (0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm), com sete repetições e quatro aves por unidade experimental. O tratamento controle (0 ppm) não continha qualquer tipo de aditivo. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 048/2010).

A própolis bruta utilizada neste experimento foi adquirida em Maringá-PR, sendo conservada em temperatura entre 2-8°C até o momento de utilização. A composição do extrato foi determinada de acordo com Singleton & Rossi (1965) e Pierpoint (2004) para polifenóis totais e utilizando o método colorimétrico cloreto de alumínio para o conteúdo de flavonoides totais. As dietas experimentais foram formuladas de forma a atender as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005), para as fases de um a sete e oito a 21 dias de idade (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Fases (dias)	
	1 a 7	8 a 21
Milho	56,38	59,26
Farelo de Soja, 45%	36,92	34,27
Óleo de Soja	1,99	2,30
Calcário	0,92	0,88
Fosfato Bicálcico	1,94	1,80
Sal	0,40	0,40
Inerte*	0,20	0,20
DL- Metionina, 98%	0,35	0,24
L- Lisina HCl, 78%	0,35	0,19
L- Treonina, 98%	0,15	0,05
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	0,40	0,40
Total	100	100
Valores calculados		
PB (%)	22,04	20,79
EMA (kcal/kg)	2,950	3,000
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442
Met + Cis, dig (%)	0,944	0,814
Lisina, dig (%)	1,330	1,146
Treonina, dig (%)	0,865	0,745
Triptofano, dig (%)	0,213	0,183

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.916.670 UI/kg; Vit. D3 583.330 UI/kg; Vit. E 8.750 UI/kg; Vit. K3 433.33 mg/kg; Vit. B1 408.33 mg/kg; Vit. B2 1.333,33 mg/kg, Vit. B12 4.166,67 mcg/kg; Niacina 8.983,33 mg/kg; Pantotenato de cálcio 3.166,67 mg/kg; Ácido Fólico 200 mg/kg; Biotina 25 mg/kg. Suplemento Mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.6 g/kg; Cobre 3.072 mg/kg; Iodo 248 mg/kg; Zinco 12.6 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 61.20 mg/kg; Cobalto 50.40 mg/kg.

\* A própolis bruta foi adicionada as rações em substituição ao inerte.

As aves foram vacinadas contra a doença de Newcastle no 14<sup>o</sup> dia de vida e aos 21 dias foi feita a colheita de amostras de sangue por punção da veia jugular de seis aves por tratamento selecionadas aleatoriamente. O sangue foi dessorado e o soro reservado para mensuração da produção de anticorpos contra a doença de Newcastle, testados através do ELISA indireto (IDEXX<sup>®</sup>) de acordo com instruções do fabricante. Os títulos avaliados foram referentes à resposta vacinal.

Aos 21 dias de idade, seis aves selecionadas aleatoriamente representando cada tratamento, com peso representativo (média±5%), foram selecionadas para determinação do perfil hematológico e do peso relativo (% do peso vivo) dos órgãos linfoides (bolsa cloacal, timo e baço).

Para a determinação do perfil hematológico preparou-se um esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro, que foi corado pelo método de May Grunwald – Giemsa. A

contagem diferencial realizada em microscópio ótico com objetiva de imersão foi classificatória para linfócitos, heterófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos, calculando a proporção de cada em cem células contadas/ave.

Cinco aves de cada tratamento também foram selecionadas ao acaso aos 21 dias de idade para avaliação da resposta imune mediada por células *in vivo*, segundo o protocolo descrito por Carrier & DeLoach (1990). Foram injetados intradermicamente, entre a terceira e a quarta prega interdigital do pé direito, 0,1 mL de fitohemaglutinina PHA-M<sup>®</sup> (Invitrogen). O mesmo volume de solução salina foi aplicado no pé esquerdo, como controle negativo. O espessamento da pele, em ambos os pés foi mensurado, com auxílio de um paquímetro digital, antes da inoculação e 12, 24, 48 e 72 horas após. Os resultados foram obtidos pela diferença entre a resposta a fitohemaglutinina e a resposta do controle, nos diferentes tempos.

Para avaliação da atividade fagocítica de macrófagos abdominais, segundo protocolo de Qureshi et al. (1986), foram utilizadas cinco aves aleatoriamente por tratamento. Aos 21 dias de idade foi injetado na cavidade peritoneal um mL para cada 100g de peso corpóreo de solução de Sephadex G-50<sup>®</sup> (Sigma) a 3% em solução salina 0,9%.

Após 42 horas as aves foram sacrificadas por deslocamento cervical e realizado o processo de limpeza (detergente neutro) e sanitização (álcool 70%) do abdômen com posterior inoculação de 20 mL de PBS estéril heparinizado (0,5 U/mL Liquevine<sup>®</sup> - Roche), sendo coletado aproximadamente 15 mL deste líquido abdominal, imediatamente acondicionado em tubos plásticos mantidos em gelo. O material coletado foi centrifugado a 1500rpm/10 minutos, sendo o pellet ressuscitado em um mL de meio RPMI 1640<sup>®</sup> (Sigma). Adicionou-se 150µL dessa suspensão a cada poço da placa de cultura, contendo lamínula de vidro de 13 mm de diâmetro e após uma hora de incubação em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, lavou-se cada poço com solução RPMI 1640, para remover as células não aderidas. Em seguida, adicionou-se 200µL de eritrócitos de carneiros (suspensão de 3% de hemácias em meio RPMI 1640) e incubou-se novamente por uma hora. Após o tempo final de incubação, lavou-se cada poço com meio RPMI 1640 e procedeu-se com o processo de coloração, utilizando kit comercial (Panótico Rápido LB<sup>®</sup> - Laborclin).

Após o processo de secagem e fixação das lamínulas em lâminas de vidro, procedeu-se a contagem de 200 macrófagos em duplicata por ave, verificando o número

de macrófagos que continham eritrócitos fagocitados e o número de eritrócitos em cada macrófago. A atividade fagocítica foi calculada considerando o número de macrófagos contendo eritrócitos fagocitados dividido pelo número total de macrófagos contados.

Concomitantemente, foi realizado este mesmo processo com uma segunda placa, sendo que após a segunda lavagem foi mantido em cada poço 200 $\mu$ L de meio RPMI 1640 e colocada em estufa por adicionais 24 horas para dosagem da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos. Cada amostra continha um controle positivo (MØ + hc) e negativo (MØ), que diferenciava quanto à presença ou não de hemácias, sendo que o negativo seria a produção espontânea de óxido nítrico pelos macrófagos. Após o período de 24 horas o líquido foi coletado e a dosagem de nitritos foi realizada por meio da reação de Griess (Qureshi et al. 1986).

Os dados de peso relativo dos órgãos linfoides, atividade de macrófagos e título de anticorpo foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial por meio do programa SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 1997).

Para os dados hematológicos primeiramente foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade. As variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância e regressão linear simples, enquanto as demais foram analisadas por meio da metodologia de modelos lineares generalizados, utilizando distribuição Gama com função de ligação inversa. Para a reação interdigital a fitohemaglutinina também foi realizado teste de Shapiro-Wilk e as variáveis com distribuição normal foram submetidas à análise de variância e regressão linear múltipla, considerando o tempo e os níveis de inclusão do EEP, sendo os resultados apresentados através de gráfico de superfície de resposta. Ambas as análises foram realizadas por meio do programa R (*R Development Core Team, 2009*).

Para comparação de resultados entre o controle e os níveis de inclusão de própolis bruta foi utilizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade. No caso da reação interdigital a fitohemaglutinina com relação ao efeito do tempo em que decorreu entre uma medida e outra foi realizado o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

### **Resultados e Discussões**

A própolis bruta utilizada neste experimento apresentou concentração de 78,75 mg/L de polifenóis totais e 11,95 mg/L de flavonoides totais. Os valores obtidos demonstram qualidade adequada, estando em concordância com valores reportados na

literatura (Funari & Ferro, 2006) e com os requisitos mínimos exigidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, 5% e 0,5% para polifenóis e flavonoides totais, respectivamente (Instrução Normativa nº3 –Anexo VI, 2001).

A inclusão de própolis bruta nas rações não influenciou ( $P>0,05$ ) os pesos relativos do timo, baço e bolsa cloacal das aves aos 21 dias de idade (Tabela 2).

O peso relativo dos órgãos linfoides é frequentemente utilizado para avaliar o sistema imunológico, sendo que alterações são relacionadas com a saúde do animal (Chichlowski et al., 2007). Apesar da não interferência do ingrediente em questão, estudos confirmam os efeitos positivos da adição de aditivos naturais sobre o desenvolvimento dos órgãos imunes (Ashayerizadeh et al., 2009; Li et al., 2009).

A própolis possui em sua composição química compostos com atividades biológicas capazes de estimular parâmetros imunológicos (Ziaran et al., 2005), desta forma, esperava-se efeito positivo sobre os pesos relativos dos órgãos pelo aumento da capacidade em produzir células do sistema imune, considerando que estes órgãos são os principais responsáveis pela imunidade humoral e celular (Warner, 1964). Entretanto, apesar desta importância o peso não deve ser considerado isoladamente, sendo necessário correlacionar com as demais medidas de imunidade (Kabir et al., 2004).

Tabela 2 – Peso relativo  $\pm$  erro padrão (%) de timo, baço e bolsa cloacal de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Timo	Bolsa Cloacal	Baço
Controle	0,682 $\pm$ 0,042	0,248 $\pm$ 0,025	0,114 $\pm$ 0,008
100 ppm	0,605 $\pm$ 0,078	0,271 $\pm$ 0,030	0,131 $\pm$ 0,013
200 ppm	0,638 $\pm$ 0,059	0,229 $\pm$ 0,027	0,105 $\pm$ 0,007
300 ppm	0,597 $\pm$ 0,079	0,239 $\pm$ 0,012	0,131 $\pm$ 0,0016
400 ppm	0,568 $\pm$ 0,084	0,215 $\pm$ 0,020	0,119 $\pm$ 0,014
500 ppm	0,624 $\pm$ 0,081	0,226 $\pm$ 0,028	0,120 $\pm$ 0,010
CV (%)	28,47	25,27	24,31
Regressão	ns	ns	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P>0,05$ )

ns = não significativo

Observou-se efeito ( $P<0,05$ ) da inclusão dietética de própolis bruta para a porcentagem de eosinófilo, com resposta linear negativa, no entanto, quando comparado cada nível de inclusão com o tratamento controle não foi observada diferença ( $P>0,05$ ). Para as contagens de linfócito, heterófilo, basófilo, monócito e a relação heterófilo:linfócito não foram detectadas diferenças ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

O número de linfócito e heterófilo obtidos são considerados normais, no entanto, para eosinófilo e basófilo os valores se encontram acima e para os monócitos abaixo dos valores de referência (Cardoso & Tessari, 2003; Laganá et al., 2005). A literatura reporta resultados contraditórios que vão desde a não influência da suplementação de própolis sobre a contagem diferencial dos leucócitos (Orsolich & Basic, 2003; Çetin et al., 2010; Shahryar et al., 2011) ao aumento de linfócitos e a redução de heterófilos (Ziaran et al., 2005; Galal et al., 2008a).

As determinações hematológicas são utilizadas como uma ferramenta no diagnóstico de alterações fisiológicas quantitativas (Al-Mansour et al., 2011). Como a alteração foi observada somente para os eosinófilos, não existe evidência suficiente para inferir que a inclusão da própolis bruta possa ter comprometido a resposta imunológica mediada por células.

Tabela 3 – Valores hematológicos (%) e a relação heterófilo:linfócito (H:L)  $\pm$  erro padrão de frangos de corte aos 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Linfócito	Heterófilo	Basófilo	Monócito	Eosinófilo	Relação H:L
Controle	62,71 $\pm$ 3,88	22,66 $\pm$ 3,45	8,19 $\pm$ 0,71	1,17 $\pm$ 0,48	5,27 $\pm$ 0,72	0,38 $\pm$ 0,07
100 ppm	60,57 $\pm$ 3,35	20,92 $\pm$ 2,82	10,58 $\pm$ 2,43	2,41 $\pm$ 0,85	5,52 $\pm$ 0,29	0,35 $\pm$ 0,06
200 ppm	68,16 $\pm$ 1,17	17,63 $\pm$ 1,48	5,79 $\pm$ 0,43	3,14 $\pm$ 0,26	5,28 $\pm$ 0,88	0,26 $\pm$ 0,03
300 ppm	66,30 $\pm$ 1,11	20,13 $\pm$ 1,60	6,45 $\pm$ 1,30	2,38 $\pm$ 0,61	4,74 $\pm$ 0,64	0,30 $\pm$ 0,03
400 ppm	65,19 $\pm$ 2,51	18,86 $\pm$ 2,09	9,97 $\pm$ 1,76	1,68 $\pm$ 0,60	4,29 $\pm$ 0,59	0,29 $\pm$ 0,04
500 ppm	63,95 $\pm$ 3,50	23,79 $\pm$ 2,70	7,93 $\pm$ 1,61	1,49 $\pm$ 0,47	2,83 $\pm$ 0,52	0,38 $\pm$ 0,06
CV (%)	9,50	25,50	39,85	62,58	33,29	33,39
Regressão	ns	ns	ns	ns	Linear <sup>1</sup>	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett (P>0,05)

ns = não significativo

<sup>1</sup>Y = 6,480897 - 0,006555x (R<sup>2</sup>=0,41); (P=0,002)

Observou-se comportamento quadrático (P<0,05) para a atividade fagocítica dos macrófagos em função dos níveis de própolis bruta, com menor atividade alcançada ao nível de 351 ppm. Quando comparado cada nível de inclusão com o controle, verificou-se que as aves que receberam rações com 100 ppm e 500 ppm de própolis apresentaram maior atividade fagocítica e maior número de hemácias fagocitadas por macrófago (P<0,05), respectivamente. Para a produção de óxido nítrico não foi observada alteração (P>0,05) (Tabela 4).

O nível de 100 ppm e 351 ppm de própolis bruta proporcionou a maior e a menor atividade fagocítica, respectivamente, levando a crer que existe uma resposta dose-

dependente conforme já descrito por Ziaran et al (2005), onde as melhores respostas imunes foram alcançadas com níveis de inclusão de 40 e 70 ppm de extrato etanólico de própolis. A diferença encontrada entre os trabalhos com relação aos melhores níveis pode estar correlacionada à forma de inclusão do ingrediente as rações, porque a própolis utilizada se apresentava na forma bruta, sem processamento anterior, podendo ter disponibilizado em menor quantidade os compostos bioativos.

Apesar da atividade fagocítica não ter sido significativa no tratamento com 500 ppm de própolis bruta, os macrófagos correspondentes a este tratamento se mostraram mais ativos. No entanto, este efeito seria válido se fosse aliado ao aumento da atividade fagocítica, pois é mais interessante um maior número de células com potencial fagocitário que o aumento de aproximadamente uma hemácia fagocitada por macrófago.

Tem sido sugerido que os componentes bioativos da própolis são capazes de aumentar as respostas imunes através do aumento da atividade fagocítica dos macrófagos além da maior produção de citocinas (Dimov et al., 1991), que podem estimular o desenvolvimento de outras células imunes (Taheri et al., 2005). Os macrófagos desempenham importantes funções de defesa no organismo animal através da fagocitose, quimiotaxia, mediação de processos inflamatórios e secreção de substâncias envolvidas nos processos imunitários (Orsi et al., 2000; Qureshi, 1998).

A atividade imunomoduladora também pode ser avaliada pela mensuração da produção de óxido nítrico pelos macrófagos, composto microbicida correlacionado com a atividade funcional dos macrófagos (Bogdan, 2001; Sforcin, 2007). A produção deste composto pelo tratamento com 100 ppm de inclusão de própolis demonstrou ser maior com relação aos demais, podendo ter ligação com a maior atividade fagocítica apresentada, no entanto, este aumento não foi significativo.



Tabela 4 – Atividade fagocítica (%), hemácias fagocitadas e concentração de óxido nítrico ( $\mu\text{m/mL}$ )  $\pm$  erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Atividade Fagocítica	Hemácias Fagocitadas	Óxido Nítrico	
			MØ + hc <sup>1</sup>	MØ <sup>2</sup>
Controle	19,788 $\pm$ 2,235	5,158 $\pm$ 0,298	11,460 $\pm$ 2,724	6,532 $\pm$ 1,382
100 ppm	27,894 $\pm$ 2,114*	5,383 $\pm$ 0,173	16,743 $\pm$ 1,348	5,306 $\pm$ 0,638
200 ppm	24,237 $\pm$ 1,098	5,761 $\pm$ 0,149	12,543 $\pm$ 0,987	7,971 $\pm$ 1,356
300 ppm	20,981 $\pm$ 1,160	5,541 $\pm$ 0,203	12,398 $\pm$ 3,473	8,902 $\pm$ 2,503
400 ppm	23,118 $\pm$ 2,576	4,480 $\pm$ 0,392	11,730 $\pm$ 2,607	7,374 $\pm$ 2,329
500 ppm	23,585 $\pm$ 1,213	6,039 $\pm$ 0,242*	12,662 $\pm$ 0,722	8,087 $\pm$ 1,685
CV (%)	15,63	9,37	39,63	51,56
Regressão	Quadrática <sup>3</sup>	ns	ns	ns

<sup>1</sup> Controle positivo = macrófagos + hemácias

<sup>2</sup> Controle negativo = macrófagos

\*Significativo pelo teste de Dunnett (P<0,05)

ns = não significativo

<sup>3</sup> Y = 34,0325 - 0,0710378x + 0,000101273x<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,91); (P=0,02); Ponto de mínima: 351 ppm

Não foi observada interação (P>0,05) entre os fatores tratamento e tempo na reação interdigital a fitohemaglutinina. A análise de variância indicou que a variável sofreu apenas efeito do tempo (P<0,05) que decorreu entre uma medida e outra (Tabela 5). No entanto, a reação apresentou comportamento quadrático (P<0,05) em função do tempo e dos níveis de inclusão de própolis bruta. De acordo com a equação ajustada, o nível de 275 ppm de própolis bruta e o tempo de 39,35 horas resultou no menor e maior valor da reação, respectivamente (Figura 1).

Este teste avalia a imunidade mediada por células, sendo a resposta linfócito-T dependente (Galal et al., 2008b). A fitohemaglutinina é capaz de induzir o aumento da população de linfócitos, ocorrendo o acúmulo destas células e a infiltração de macrófagos 24 horas após o início da resposta cutânea (McCorkle et al., 1980). Este teste também é chamado de reação de hipersensibilidade basofílica cutânea por ter os basófilos associados nessas reações (Cardoso & Tessari, 2003).

Tabela 5 – Reação interdigital a fitohemaglutinina (mm)  $\pm$  erro padrão em frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	12h	24h	48h	72h	Média do tratamento
Controle	0,530 $\pm$ 0,046	0,564 $\pm$ 0,065	0,759 $\pm$ 0,058	0,424 $\pm$ 0,033	0,569
100 ppm	0,555 $\pm$ 0,067	0,673 $\pm$ 0,093	0,901 $\pm$ 0,060	0,600 $\pm$ 0,088	0,682
200 ppm	0,453 $\pm$ 0,089	0,573 $\pm$ 0,107	0,683 $\pm$ 0,158	0,474 $\pm$ 0,081	0,546
300 ppm	0,531 $\pm$ 0,127	0,551 $\pm$ 0,105	0,634 $\pm$ 0,130	0,304 $\pm$ 0,094	0,505
400 ppm	0,740 $\pm$ 0,136	0,759 $\pm$ 0,168	0,828 $\pm$ 0,109	0,493 $\pm$ 0,089	0,705
500 ppm	0,641 $\pm$ 0,075	0,834 $\pm$ 0,141	0,753 $\pm$ 0,116	0,573 $\pm$ 0,087	0,700
Média do tempo	0,566bc	0,652ab	0,745a	0,469c	
CV (%)	39,15	40,02	35,59	42,43	
<b>Anova</b>					
Tratamento	ns				
Tempo	*				
<b>Regressão</b>					
Tratamento x Tempo	ns				
Efeito de tempo	Quadrático <sup>1</sup> (P=0,0002)				
Efeito de tratamento	Quadrático <sup>1</sup> (P=0,01)				

ns = não significativo

\*Médias seguidas por letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05)

<sup>1</sup>Y = 0,5771 + 0,01967\*hora - 0,0002499\*hora<sup>2</sup> - 0,002105\*nível + 0,000003821\*nível<sup>2</sup> (R<sup>2</sup> = 0,72)

Apesar do nível de inclusão de 275 ppm de própolis bruta ter apresentado o menor valor da reação não foram observadas alterações (P>0,05) no peso do timo e na contagem de células T sanguíneas, considerando que 80 a 90% dos leucócitos circulantes são linfócitos T (Ziara et al., 2005). Desta forma, se avaliar estas respostas em conjunto, pode-se inferir que os animais alimentados com este nível de própolis bruta não tiveram a resposta imunológica mediada por células prejudicada.

Com relação ao tempo, independente do nível de inclusão da própolis bruta, houve uma maior reação no tempo de 39,35 horas, demonstrando que os animais não apresentaram resposta imunológica rápida se comparados com trabalhos que avaliaram a imunidade celular de aves alimentadas com própolis (Galal et al., 2008a; Abd El – Motaal et al., 2008). A redução da reação ao longo do tempo já era esperada pela regulação dos eventos fisiológicos com recrutamento das células que exercem suas funções combatendo agentes estranhos.

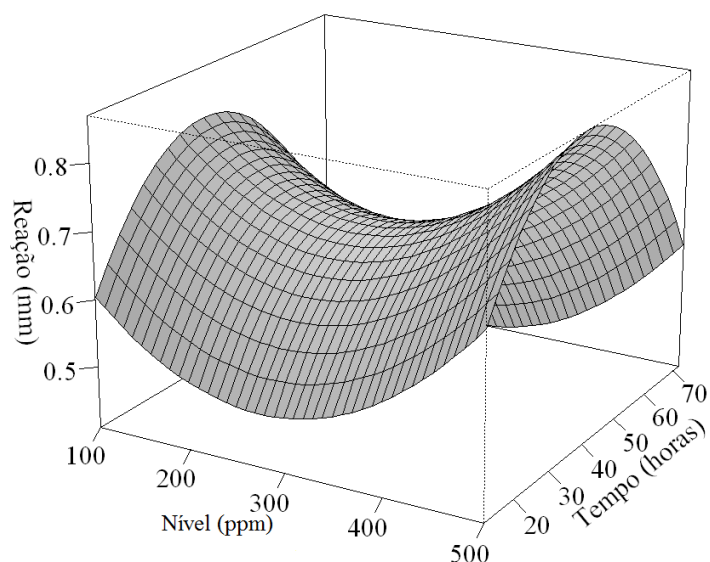


Figura 1. Superfície de resposta para a reação interdigital a fitohemaglutinina em função do nível de inclusão de própolis bruta e o tempo da análise de frangos de corte aos 21 dias de idade alimentados com rações contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Uma possível explicação para os resultados obtidos quanto ao comportamento quadrático apresentado tanto para as análises da atividade dos macrófagos quanto para a reação interdigital a fitohemaglutinina seria a forma bruta da própolis que foi adicionada às rações.

A própolis *in natura* é composta por aproximadamente 30% de cera, 50% de resina e bálsamos vegetais, 10% de óleos essenciais e aromáticos e 5% de pólen e outras substâncias (Burdock, 1998). Desta forma, os diferentes compostos estão complexados com estes componentes, passando geralmente por um processamento de extração com solventes como etanol, metanol e água (Cunha et al., 2004), para liberação das substâncias. Assim, a própolis bruta pode ter demonstrado resistência às enzimas digestivas presentes no trato gastrointestinal, sendo que, apesar da presença destes elementos funcionais, estes podem não ter sido disponibilizados em sua totalidade e igualmente para o organismo das aves.

A suplementação de própolis bruta nas rações não influenciou ( $P>0,05$ ) a concentração dos anticorpos séricos contra a doença de Newcastle aos 21 dias de idade (Tabela 6).

Estudos demonstram que as substâncias presentes na própolis possuem efeitos benéficos sobre a imunidade humoral (Ziaran et al., 2005; Çetin et al., 2010; Freitas et al., 2011). O mecanismo de ação não está completamente elucidado, até mesmo por considerar a composição química deste ingrediente muito complexa (Salatino et al., 2005), porém, acredita-se que haja um sinergismo entre as respostas imunes humoral e celular. Os compostos podem interferir na ativação dos macrófagos e citocinas por eles produzidos (Dimov et al., 1991; Orsi et al., 2005; Ramos & Miranda, 2007) e estas substâncias estão envolvidas com a estimulação dos linfócitos B que são capazes de produzir os anticorpos (Ansorge et al., 2003; Taheri et al., 2005).

Tabela 6 – Título de anticorpos ( $\text{Log}_{10}$ )  $\pm$  erro padrão de frangos de corte com 21 dias de idade, alimentados com dietas com diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de Própolis Bruta	Título
Controle	2,450 $\pm$ 0,068
100 ppm	2,444 $\pm$ 0,085
200 ppm	2,435 $\pm$ 0,083
300 ppm	2,565 $\pm$ 0,083
400 ppm	2,476 $\pm$ 0,079
500 ppm	2,365 $\pm$ 0,092
CV (%)	7,47
Regressão	ns

Não significativo pelo teste de Dunnett ( $P > 0,05$ )

ns = não significativo

Desta forma, como a própolis foi capaz de influenciar a atividade fagocítica dos macrófagos, esperava-se ação adjuvante deste aditivo, potencializando a produção de anticorpos. No entanto, o que pode ter ocorrido é que a máxima resposta da produção dos anticorpos ocorreu mais tardiamente, como reportado por Kong et al. (2006) que verificaram que somente 21 dias após a administração da vacina de Newcastle os animais apresentaram maiores títulos de anticorpos. Se a mensuração da produção de anticorpos tivesse sido realizada mais tardiamente poderiam ter sido observados resultados benéficos.

### Conclusão

A inclusão de própolis bruta nas rações de frangos de corte, na fase inicial, se mostrou eficaz como agente imunoestimulante nas respostas mediadas por células.

### Referências

- ABD EL-MOTAAL, AM; AHMED, AMH, BAHAKAIM, ASA et al. Productive performance and immunocompetence of commercial laying hens given diets supplemented with eucalyptus. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.5, p. 445-449, 2008.
- AL-MANSOUR, S; AL-KHALF, A; AL-HOMIDAN, I et al. Feed efficiency and blood hematology of broiler chicks given a diet supplemented with yeast culture. **International Journal of Poultry Science**, v.10, n.8, p. 603-607, 2011.
- ANSORGE, S; REINHOLD, D; LENDECKEL, U. Propolis and some of its constituents down-regulate DNA synthesis and inflammatory cytokine production but induce TGF- $\beta$ 1 production of human immune cells. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.58c, p. 580-589, 2003.
- ASHAYERIZADEH, O; DASTAR, B; SHAMS SHARGH, M et al. Influence of antibiotic, prebiotic and probiótico supplementation to diets on carcass characteristics, hematological indices and internal organ size of young broiler chickens. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.8, n.9, p. 1772-1776, 2009.
- BANKOVA, V; CASTRO, SL; MARCUCCI, MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.
- BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature Immunology**, v.2, n.10, 2001.
- Brasil Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº3 – Anexo VI – Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 19 jan. 2001.
- BURDOCK, GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 347-363, 1998.
- CARDOSO, ALSP; TESSARI, ENC. Estudo dos parâmetros hematológicos em frangos de corte. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.70, n.4, p. 419-424, 2003.
- ÇETIN, E; SILICI, S; ÇETIN, N et al. Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. **Poultry Science**, v.89, p.1703-1708, 2010.
- CHICHLOWSKI, M; CROOM, J; EDENS, FW et al. Microarchitecture and spatial relationship between bacterial and ileal, cecal and colonic epithelium in chicks fed a direct-fed microbial, primalac and salinomycin. **Poultry Science**, v.86, p. 1121-1132, 2007.
- CORRIER, DE; DeLOACH, JR. Evaluation of cell-mediated, cutaneous basophil hypersensitivity in young chickens by an interdigital skin test. **Poultry Science**, v.69, p.403-408, 1990.
- CUNHA, IBS; SAWAYA, ACHF, CAETANO, FM et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 6, p. 964-970, 2004.
- DAUGSCH, A; MORAES, CS; FORT, P et al. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.5, n.4, p. 435-441, 2008.
- DIBNER, JJ; RICHARDS, JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v.84, p. 634-643, 2005.
- DIMOV, V; IVANOVSKA, N; MANOLOVA, N et al. Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti-infectious protection and macrophage function. **Apidologie**, v.22, p. 155-162, 1991.

- FREITAS, JA; VANAT, N; PINHEIRO, JW et al. The effects of propolis on antibody production by laying hens. **Poultry Science**, v.90, p. 1227-1233, 2011.
- FUNARI, CS; FERRO, VO. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p. 171-178, 2006.
- GALAL, A; ABD EL-MOTAAL, AM; Ahmed, AMH et al. Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.3, p. 272-278, 2008a.
- GALAL, A; AHMED, AMH; ALI, WAH et al. Residual feed intake and its effect on cell-mediated immunity in laying hens given different propolis levels. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.11, p. 1105-1111, 2008b.
- HAGHIGHI, HR; GONG, J; GYLES, C et al. Modulation of antibody-mediated immune response by probiotics. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.12, n.2, p. 1387-1392, 2005.
- HAN, SM; LEE, KG; YEO, JH et al. Effects of honeybee venom supplementation in drinking water on growth performance of broiler chickens. **Poultry Science**, v.89, p. 2396-2400, 2010.
- JANARDHANA, V; BROADWAY, MM; BRUCE, MP et al. Prebiotics modulate immune responses in the gut-associated lymphoid tissue of chickens. **The Journal of Nutrition**, v.139, n.7, p. 1404-1409, 2009.
- KABIR, SML; RAHMAN, MM; RAHMAN, MB et al. The dynamics of probiotics on growth performance and immune response in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.3, n.5, p. 361-364, 2004.
- KONG, XF; LU, YL; YIN, YL et al. Chinese herbal ingredients are effective immune stimulators for chickens infected with the Newcastle disease virus. **Poultry Science**, v.85, p. 2169-2175, 2006.
- LAGANÁ, C; RIBEIRO, AML; GONZALEZ, FHD et al. Suplementação de vitaminas e minerais orgânicos nos parâmetros bioquímicos e hematológicos de frangos de corte em estresse por calor. **Boletim de Indústria Animal**, v.62, n.2, p. 157-165, 2005.
- LI, SP; ZHAO, XJ; WANG, JY. Synergy of *Astragalus* polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v.88, p. 519-525, 2009.
- LOFTY, M. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, p. 22-31, 2006.
- McCORKLE, F; OLAH, I; GLICK, B. The morphology of the phytohemagglutinin-induced cell response in the chicken's wattle. **Poultry Science**, v.59, p. 616-623, 1980.
- ORSI, RO; FUNARI, SRC; SOARES, AMVC et al. Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.6, n.2, p. 205-219, 2000.
- ORSI, RO; SFORCIN, JM; FUNARI, SR et al. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v.5, n.2, p. 359-368, 2005.
- ORSOLIC, N; BASIC, I. Immunomodulation by water-soluble derivative of propolis: a factor of antitumor reactivity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p. 265-273, 2003.
- PIERPOINT, WS. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v.244, p. 65-74, 2004.

- QURESHI, MA. Role of macrophages in avian health and disease. **Poultry Science**, v.77, p. 978-982, 1998.
- QURESHI, MA; DIETERI, RR; BACON, LD. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. *In: The Society for Experimental Biology and Medicine. Proceedings*, v.181, p. 560-568, 1986.
- RAMOS, AFN; MIRANDA, JL. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.13, n.4, p. 697-710, 2007.
- ROSTAGNO, HS; ALBINO, LFT; DONZELE, JL et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186p.
- SALATINO, A; TEIXEIRA, EW; NEGRI, G et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.2, n.1, p. 33-38, 2005.
- SFORCIN, JM. Propolis and the immune system: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.113, p. 1-14, 2007.
- SHAHRYAR, HÁ; NAMVARI, M; NOUROLLAHI, H et al. Effect of alcoholic extract propolis in immune system in broiler chickens. **Journal of Basic and Applied Scientific Research**, v.1, n.11, p. 2094-2097, 2011.
- SINGLETON, VL; ROSSI Jr, JA. Colorimetry of total phenolics whit phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p. 144-158, 1965.
- TAHERI, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Humoral immunity of broilers is affected by oil extracted propolis (OEP) in the diet. **International Journal of Poultry Science**, v.4, n.6, p. 414-417, 2005.
- TRUSHEVA, B; POPOVA, M; BANKOVA, V et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.3, n.2, p. 249-254, 2006.
- WARNER, NL. The immunological role of different lymphoid organs in the chicken. **Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science**, v.42, p. 401-416, 1964.
- ZIARAN, HR; RAHMANI, HR; POURREZA, J. Effect of dietary oil extract of propolis on immune response and broiler performance. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.8, n.10, p. 1485-1490, 2005.

## VII - Microbiota cecal de frangos de corte alimentados com extrato etanólico de própolis mensurada por hibridização fluorescente *in situ*

**Resumo** – O objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota cecal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis (EEP) por meio da hibridização fluorescente *in situ* e citometria de fluxo. Foram utilizados 192 pintos de corte, machos, criados em gaiolas de metabolismo até os 21 dias de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão de EEP (0, 1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 ppm), oito repetições e quatro aves por unidade experimental. Os diferentes níveis de inclusão de EEP proporcionaram decréscimo linear ( $P < 0,05$ ) na porcentagem do grupo *Gammaproteobacteria* com o aumento dos níveis. Quando comparado cada nível de inclusão de EEP com o tratamento controle foi observado aumento ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de *Gammaproteobacteria* nos animais alimentados com 1000 ppm. Quanto aos grupos *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Lactobacillus* spp. e *Enterobacteriaceae* não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ). A suplementação de EEP nas dietas foi eficaz em reduzir a população de *Gammaproteobacteria*, bactérias potencialmente nocivas, nos cecos de frangos de corte.

**Palavras-chave:** atividade antibacteriana, citometria de fluxo, hibridização *in situ* por fluorescência, população microbiana



## VII - Cecal microbiota of broiler chickens fed with ethanolic extract of propolis measured by fluorescent *in situ* hybridization

**Abstract** – The present study aimed to characterize the cecal microbiota of broiler chickens fed with diets containing different levels of ethanolic extract of propolis (EEP) by fluorescent *in situ* hybridization and flow cytometry. A total of 192 birds, raised in metabolism cages until the 21<sup>st</sup> day were distributed in a completely randomized design to six treatments (EEP supplement levels of 0, 1000, 2000, 3000, 4000 and 5000 ppm) and eight replications and four birds per experimental unit. The different levels of inclusion of EEP gave a linear decrease ( $P < 0.05$ ) in the percentage of *Gammaproteobacteria* population, with increased EEP doses. There was an increase ( $P < 0.05$ ) in the percentage of occurrence of *Gammaproteobacteria* group to the inclusion of 1000 ppm of EEP when compared to control. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in the percentage of *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae*, *Lactobacillus* spp. and *Enterobacteriaceae* group. The supplementation of EEP in the diets was able to decrease the population of *Gammaproteobacteria*, potentially harmful bacteria, in the ceca of broiler chickens.

**Key words:** antibacterial activity, flow cytometry, fluorescence *in situ* hybridization, microbial population

### Introdução

O trato gastrointestinal possui uma comunidade microbiana diversa, responsável por importantes funções como destoxificação de compostos e proteção do organismo contra patógenos (Amit-Romach et al., 2004). Dentre os microrganismos presentes, o grupo em maior concentração é representado por bactérias, benéficas e patogênicas, podendo ocasionar diversos efeitos sobre a saúde do animal (Dumonceaux et al., 2006).

Por muitos anos o controle desta microbiota foi realizado pela adição em doses subterapêuticas de antibióticos, que era capaz de promover melhor saúde intestinal aos animais, refletindo sobre os índices produtivos (Dibner & Richards, 2005; Castanon, 2007). No entanto, a proibição dos antibióticos com função de modulador de crescimento é realidade em muitos países (Engster et al., 2002; Casewell et al., 2003) o que tem aumentado o interesse por alternativas que possam substituir os antibióticos, porém com mesma capacidade de manipulação da comunidade microbiana.

Diversos são os ingredientes que são estudados como estratégias nutricionais (Yang et al., 2009), tendo a própolis recebido destaque pelas suas inúmeras atividades biológicas, dentre elas, a antibacteriana (Lofty, 2006). A própolis constitui numa substância resinosa e balsâmica, obtida de flores, ramos, brotos, exsudatos e de outras partes do tecido vegetal pelas abelhas melíferas, que processam este produto adicionando cera e secreções salivares (Scazzocchio et al., 2006; Tekeli et al., 2010). As propriedades farmacológicas apresentadas são relacionadas à sua complexa composição química, que inclui ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos, compostos fenólicos e predominantemente flavonoides (Galal et al., 2008). Estes compostos podem ser extraídos da parte solúvel da própolis com o uso de solventes, obtendo o produto denominado extrato etanólico de própolis (Cunha et al., 2004).

Pesquisas envolvendo a própolis indicam que os componentes biologicamente ativos podem afetar a ocorrência de algumas espécies bacterianas como *Enterococcus* sp. e *Lactobacillus acidophilus* (Haddadin et al., 2008; Krocko et al., 2012). Desta forma, considerando que a população microbiana intestinal pode ser modificada através de fatores externos como a adição de ingredientes nas dietas dos animais, a caracterização desta microbiota se faz necessária para comprovar a eficácia da própolis como modulador de desempenho.

Os estudos para determinar a população bacteriana presente no trato gastrointestinal dos animais são realizados através do método de cultura, no entanto,

pela dificuldade técnica apresentada, por exigência de condições anaeróbias estritas (Zhu et al., 2002), novos métodos são pesquisados. Além disso, possuem limitações na identificação dos organismos, porque apenas uma parcela desta comunidade, 10 a 60%, é passível de ser cultivada (Gong et al., 2007).

Neste sentido, as técnicas moleculares têm revelado uma grande diversidade e complexidade da microbiota gastrointestinal de frangos de corte (Lu et al., 2003). A hibridização *in situ* de bactérias intactas utilizando sequência complementar de ácidos nucleicos, por meio de sondas marcadas com fluorescência e detecção por citômetro de fluxo tem se mostrado eficaz na quantificação e distribuição de amostras complexas de bactérias (Amann et al., 1990; Zhu & Joergert, 2003; Olsen et al., 2008).

Considerando os fatos, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota cecal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de extrato etanólico de própolis por meio da hibridização fluorescente *in situ* e citometria de fluxo.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para o ensaio foram utilizadas 192 aves de corte de um dia de idade, machos, linhagem Cobb-Vantress, criadas em gaiolas de metabolismo até aos 21 dias de idade. As gaiolas foram posicionadas dentro de um galpão convencional, com cobertura de telha fibrocimento, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 metros de altura.

Durante os primeiros cinco dias de vida, os pisos das gaiolas foram forrados com papel kraft e trocados diariamente. As gaiolas foram equipadas com comedouros de cano de PVC e bebedouros tipo copo de pressão, os quais foram substituídos gradativamente por bebedouros automáticos tipo copo. Para o aquecimento inicial dos pintos foram utilizadas lâmpadas infravermelhas dispostas em um suporte de madeira posicionado na parte traseira das gaiolas.

As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas diariamente dentro do galpão, foram respectivamente, de 22°C e 29°C e a umidade relativa média de 56%.

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente ao acaso com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão do extrato etanólico de

própolis (EEP) (0; 1000; 2000; 3000; 4000 e 5000 ppm) nas rações, com oito repetições e quatro aves por unidade experimental. O tratamento controle (0 ppm) não continha qualquer tipo de aditivo. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 048/2010).

O EEP, composto por 50% de própolis e 50% de álcool etílico, foi adquirido em Maringá-PR e conservado em temperatura entre 2-8°C até o momento de utilização. A composição do extrato foi determinada de acordo com Singleton & Rossi (1965) e Pierpoint (2004) para polifenóis totais e utilizando o método colorimétrico cloreto de alumínio para o conteúdo de flavonoides totais.

As dietas experimentais foram formuladas para atender as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005), para as fases de um a sete e oito a 21 dias de idade (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Fases (dias)	
	1 a 7	8 a 21
Milho	55,75	58,63
Farelo de Soja, 45%	37,04	34,39
Óleo de Soja	2,20	2,51
Calcário	0,92	0,88
Fosfato Bicálcico	1,94	1,80
Sal	0,40	0,40
Inerte*	0,50	0,50
DL- Metionina, 98%	0,36	0,24
L- Lisina HCl, 78%	0,35	0,19
L- Treonina, 98%	0,15	0,05
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	0,40	0,40
Total	100	100
Valores calculados		
PB (%)	22,04	20,79
EMA (kcal/kg)	2,950	3,000
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442
Met + Cis, dig (%)	0,944	0,814
Lisina, dig (%)	1,330	1,146
Treonina, dig (%)	0,865	0,745
Triptofano, dig (%)	0,213	0,183

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.916.670 UI/kg; Vit. D3 583.330 UI/kg; Vit. E 8.750 UI/kg; Vit. K3 433.33 mg/kg; Vit. B1 408.33 mg/kg; Vit. B2 1.333,33 mg/kg, Vit. B12 4.166,67 mcg/kg; Niacina 8.983,33 mg/kg; Pantotenato de cálcio 3.166,67 mg/kg; Ácido Fólico 200 mg/kg; Biotina 25 mg/kg. Suplemento Mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.6 g/kg; Cobre 3.072 mg/kg; Iodo 248 mg/kg; Zinco 12.6 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 61.20 mg/kg; Cobalto 50.40 mg/kg.

\* O extrato etanólico de própolis foi adicionado as rações em substituição ao inerte.

Aos 21 dias de idade, cinco aves representando a média de peso do tratamento ( $\pm 5\%$ ) foram selecionadas aleatoriamente para caracterização da microbiota intestinal. As aves foram insensibilizadas por choque elétrico e sacrificadas para remoção dos cecos que foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento. Posteriormente, obteve-se o conteúdo cecal e cada amostra foi diluída em solução estoque estéril (1% peptone, 15% glicerol em água) na proporção de 1:10, sendo novamente estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A fixação das células foi realizada de acordo com metodologia proposta por Amann et al. (1990). Para tanto, um volume de suspensão celular foi homogeneizado com três volumes de solução de formaldeído (4% em PBS) e incubado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 16 horas. A amostra foi então centrifugada por dois minutos a 12000 rpm, ressuspendida em 500  $\mu\text{l}$  de PBS e novamente centrifugada. O pellet formado foi ressuspendido em 500  $\mu\text{l}$  de PBS e 500  $\mu\text{l}$  de álcool absoluto. A estocagem do material foi realizada a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processo de hibridização ser realizado.

A hibridização das células fixadas foi realizada adaptando o protocolo previamente publicado por Zoetendal et al. (2002). Para cada hibridização 200  $\mu\text{l}$  de suspensão de células foi centrifugada a 12000 rpm por três minutos e ressuspendida em 100  $\mu\text{l}$  de solução de hibridização (0,9M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1% [peso/volume] SDS) e adicionado respectivamente sondas com fluorocromo Cy-5 (100 ng/ $\mu\text{l}$ ) (Tabela 2). As amostras foram incubadas por 16 horas a  $50^{\circ}\text{C}$  no escuro, em forno de hibridização. Após este período, 900  $\mu\text{l}$  de solução tampão baixa concentração salina pré-aquecida (0,225 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA) foi adicionada as amostras e incubado a  $50^{\circ}\text{C}$  por cinco minutos e ressuspendido novamente na solução tampão baixa concentração salina pré-aquecida, sendo este procedimento realizado por duas vezes adicionais. Após este processamento, as células foram centrifugadas a 12000 rpm por cinco minutos e ressuspensas em um mL de solução PBS gelada (pH 8,4).

Tabela 2 – Sondas utilizadas para processo de hibridização fluorescente *in situ*.

Sonda	Sequência (5' – 3')	Grupo alvo	Referência
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	Amann et al. (1990)
LGC354A	TGGAAGATTCCTACTGC	<i>Lactobacillus</i> spp.	Meier et al. (1999)
Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	<i>Clostridiaceae</i>	Franks et al. (1998)
Entbac	CATGAATCACAAAGTGGTAAG	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mittelman et al. (1997)
Gam42a	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz et al. (1992)
Bac 303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Bacteroidaceae</i>	Manz et al. (1996)

As amostras foram analisadas utilizando o aparelho citômetro de fluxo (FACScalibur) e as proporções de células hibridizadas com as sondas foram calculadas contra 10.000 eventos. Esta proporção foi corrigida subtraindo a proporção encontrada em amostras hibridizadas sem sondas. A porcentagem de bactéria foi calculada considerando a proporção encontrada com a sonda Eub338 como sendo o total de bactéria (100%). Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada sonda utilizada.

Como procedimento estatístico, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial utilizando o programa SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 1997). Para comparação de resultados entre o tratamento controle com cada um dos níveis de inclusão de EEP foi utilizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

### Resultados e Discussão

A concentração de polifenóis e flavonoides totais encontrada no EEP foi de 357,71 mg/L e 112,72 mg/L, respectivamente. O grupo dos flavonoides é considerado de grande importância pelo potencial de ação antibacteriano (Cushnie & Lamb, 2005), sendo que a presença deste composto é utilizada como parâmetro de qualidade dos produtos.

A caracterização da microbiota foi focada na determinação de cinco grupos, *Lactobacillus* spp representando as bactérias estritamente benéficas, *Bacteroidaceae* as potencialmente benéficas e *Clostridiaceae*, *Gammaproteobacteria* e *Enterobacteriaceae* as potencialmente nocivas. As bactérias reconhecidas pela sonda Entbac também são identificadas pela Gam42a, por fazer parte desta classe de bactérias gram-negativas.

A suplementação dietética de EEP proporcionou decréscimo linear ( $P < 0,05$ ) na concentração do grupo *Gammaproteobacteria*. Quando comparado cada nível de inclusão de EEP com o tratamento controle foi observado aumento ( $P < 0,05$ ) na

porcentagem de *Gammaproteobacteria* nos animais alimentados com 1000 ppm. Quanto aos demais grupos bacterianos não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 – Grupos bacterianos (% da contagem apresentada pela sonda Eub338) ( $\pm$  erro padrão) em amostras do ceco de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de extrato etanólico de própolis (EEP).

Níveis de EEP	Chis 150 <sup>1</sup>	Bac 303 <sup>2</sup>	LGC354A <sup>3</sup>	Gam42a <sup>4</sup>	Entbac <sup>5</sup>
Controle	4,51 $\pm$ 0,42	3,97 $\pm$ 0,80	5,15 $\pm$ 0,87	4,96 $\pm$ 0,44	1,61 $\pm$ 0,32
1000 ppm	5,42 $\pm$ 1,24	4,03 $\pm$ 0,67	4,73 $\pm$ 0,74	10,56 $\pm$ 1,19*	3,08 $\pm$ 1,25
2000 ppm	2,65 $\pm$ 0,42	3,51 $\pm$ 0,87	3,26 $\pm$ 0,94	8,72 $\pm$ 2,05	1,72 $\pm$ 0,60
3000 ppm	3,83 $\pm$ 1,16	5,11 $\pm$ 1,33	3,08 $\pm$ 0,20	6,01 $\pm$ 0,69	1,22 $\pm$ 0,18
4000 ppm	1,93 $\pm$ 0,65	4,57 $\pm$ 0,67	4,55 $\pm$ 1,70	6,29 $\pm$ 1,38	2,10 $\pm$ 0,81
5000 ppm	3,55 $\pm$ 1,12	4,29 $\pm$ 1,56	4,58 $\pm$ 0,61	5,82 $\pm$ 1,01	2,11 $\pm$ 0,34
CV (%)	47,39	47,50	47,38	37,34	64,23
Regressão	ns	ns	ns	Linear <sup>6</sup>	ns

<sup>1</sup> Clostridiaceae

<sup>2</sup> Bacteroidaceae

<sup>3</sup> Lactobacillus spp.

<sup>4</sup> Gammaproteobacteria

<sup>5</sup> Enterobacteriaceae

<sup>6</sup>  $Y = 10,9051 - 0,00115319x$  ( $R^2 = 0,80$ ); ( $P = 0,02$ )

\* Significativo pelo teste de Dunnett ( $P < 0,05$ )

ns = não significativo

Observou-se maior disparidade na porcentagem dos grupos *Clostridiaceae* e *Enterobacteriaceae* entre as amostras cecais de animais suplementados com EEP. Apesar do efeito quadrático ter ajustado a probabilidade de 13 e 14%, respectivamente, não foi considerado nos resultados. No entanto, é importante salientar esta interferência nos grupos acima citados, sendo encontrada uma menor porcentagem de cada população ao nível de aproximadamente 3000 ppm de EEP.

De acordo com os resultados obtidos a concentração das bactérias potencialmente nocivas (*Gammaproteobacteria*), gram-negativas, foi reduzida com doses crescentes de EEP, confirmando efeito dos compostos encontrados na própolis sobre as populações bacterianas do trato gastrointestinal. O grupo *Gammaproteobacteria* inclui as bactérias patogênicas *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, e *Pseudomonas* (Williams et al., 2010). *Escherichia coli*, outro membro deste grupo, se apresenta usualmente como espécies comensais (Rasko et al., 2008).

Estes resultados se encontram diferentes da maioria dos relatos, os quais demonstram que a ação antibacteriana da própolis é mais acentuada com relação às bactérias gram-positivas, provavelmente pela menor complexidade química da parede

celular destas bactérias (Kujumgiev et al., 1999, Mohammadzadeh et al., 2007). A inconsistência entre estudos utilizando própolis como modulador de desempenho natural se deve a grande variabilidade na composição química, diferenças quanto às seções intestinais utilizadas para a contagem bacteriana e os métodos utilizados para identificação.

Estudos anteriores demonstraram que 400 ppm e 1000 ppm de extrato de própolis proporcionam aumento no número de bactérias benéficas (ácidos lácticos) acompanhado pelo decréscimo das bactérias nocivas (*Escherichia coli*, *Enterococcus* sp., *Enterobacteriaceae*) (Tekeli et al., 2010; Krocko et al., 2012). Uma das formas de se manter a saúde do animal e garantir melhor digestão e absorção de nutrientes é aumentar a população de bactérias benéficas reduzindo a colonização por aquelas consideradas patógenas (Li et al., 2009).

Desta forma, o potencial diferenciado do EEP utilizado neste estudo pode estar relacionado aos níveis mais elevados de inclusão do ingrediente, associado a maior concentração do extrato (50% de própolis e 50% de álcool etílico). Em concordância estão os dados observados por Orsi et al. (2005) que relataram que o crescimento *in vitro* de *Salmonella* somente foi inibido com altas concentrações de EEP. Em adição, Haddadin et al. (2008) verificaram que o efeito antimicrobiano da própolis é dependente da concentração utilizada, podendo apresentar ao mesmo tempo efeitos benéficos e adversos sobre algumas espécies bacterianas.

A capacidade modulatória da microbiota intestinal pela própolis é por causa de sua atividade antibacteriana, capaz de inibir o crescimento de diversos microrganismos (Mohammadzadeh et al., 2007). Esta capacidade ainda não possui seu mecanismo de ação completamente elucidado, no entanto, acredita-se que os compostos biologicamente ativos possam desnaturar proteínas na parede celular bacteriana aumentando sua permeabilidade aos fluidos intracelulares ocasionando sua eliminação (Tekeli et al., 2010). Além deste efeito, cita-se como provável estímulo sobre o crescimento das bactérias benéficas pelo fato destes microrganismos serem capazes de metabolizar os compostos fornecendo energia suplementar as células (García-Ruiz et al., 2008).

O método de hibridização fluorescente *in situ* com sondas de oligonucleotídeos 16S rRNA, mostrou-se eficaz na estimativa da composição microbiana. Ainda são conflitantes os resultados com relação à população cecal de frangos de corte, no entanto,



são relatadas como predominante às bactérias da ordem *Clostridiales* e do filo *Bacteroidetes* (Dumonceaux et al., 2006).

Os relatos controversos à respeito da microbiota cecal de frangos de corte, se deve ao fato de sua modulação ser susceptível a fatores como dieta (Geier et al., 2009), sexo (Lumpkins et al., 2008), idade (Knarreborg et al., 2002), entre outros, favorecendo de forma diferenciada determinadas espécies bacterianas. No entanto, as porcentagens relativas obtidas entre os grupos examinados são coerentes ao observado por Eying et al. (2011) utilizando mesmo protocolo de análise.

A interferência sobre as bactérias do grupo *Gammaproteobacteria*, potencialmente nocivas ao organismo animal, observada pela utilização do EEP é de grande valia, considerando que estas bactérias podem estar envolvidas com infecções sistêmicas e produção de toxinas (Jeurissen et al., 2002). Como consequência, a ocorrência de diversos eventos pode ser reduzida, como a competição por nutrientes, entre as bactérias benéficas e patogênicas, o rápido *turnover* das células epiteliais absorptivas e a indução de respostas inflamatórias no trato gastrointestinal dos animais (Yegani & Korver et al., 2008).

Deve-se destacar ainda a importância dos resultados obtidos colaborando no desenvolvimento de novas estratégias nutricionais frente à ausência de antibióticos nas rações.

### **Conclusão**

A suplementação de extrato etanólico de própolis nas dietas foi eficaz em reduzir a população de *Gammaproteobacteria*, bactérias potencialmente nocivas, nos cecos de frangos de corte.

### Referências

- AMANN, RI; BINDER, BJ; OLSON, RJ et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, 1990.
- AMIT-ROMACH, E; SKLAN, D; UNI, Z. Microflora ecology of the chicken intestine using 16S ribosomal DNA primers. **Poultry Science**, v.83, p. 1093-1098, 2004.
- CASEWELL, M; FRIIS, C; MARCO, E et al. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p. 159-161, 2003.
- CASTANON, JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v.86, p. 2466-2471, 2007.
- CUNHA, IBS; SAWAYA, ACHF, CAETANO, FM et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 6, p. 964-970, 2004.
- CUSHNIE, TPT; LAMB, AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p. 343-356, 2005.
- DIBNER, JJ; RICHARDS, JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v.84, p. 634-643, 2005.
- DUMONCEAUX, TJ; HILL, JE; HEMMINGSEN, SM et al. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p. 2815-2823, 2006.
- ENGSTER, HM; MARVIL, D; STEWART-BROWN, B. The effect of withdrawing growth promoting antibiotics from broiler chickens: a long-term commercial industry study. **The Journal of Applied Poultry Research**, v.11, p. 431-436, 2002.
- EYNG, C; PEDROSO, AA; LEE, MD. Characterization of the intestinal microbiota of chickens with deprived growth. **Poultry Science**, v.90 (E-Suppl. D), 2011.
- FRANKS, AH; HARMSSEN, HJ, RAANGS, GC et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p. 3336-3345, 1998.
- GALAL, A; ABD EL-MOTAAL, AM; AHMED, AMH et al. Productive performance and immune response of laying hens as affected by dietary propolis supplementation. **International Journal of Poultry Science**, v.7, n.3, p. 272-278, 2008.
- GARCÍA-RUIZ, A; BARTOLOMÉ, B; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, AJ et al. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. **Food Control**, v.19, p. 835-841, 2008.
- GEIER, MS; TOROK, VA; ALLISON, GE et al. Indigestible carbohydrates alter the intestinal microbiota but do not influence the performance of broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v.106, p. 1540-1548, 2009.
- GONG, J; SI, W; FORSTER, RJ et al. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. **Federation of European Microbiological Societies**, v.59, p. 147-157, 2007.
- HADDADIN, MSY; NAZER, I; RADDAD, SJA et al. Effect of propolis on two bacterial species with probiótico potential. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.7, n.2, p. 391-394, 2008.
- JEURISSEN, SHM; LEWIS, F; VAN der KLIS, JD et al. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.3, p. 1-14, 2002.

- KNARREBORG, A; SIMON, MA; ENGBERG, RC et al. Effects of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.12, p. 5918-5924, 2002.
- KROCKO, M; CANIGOVA, M; BEZEKOVA, J et al. Effect of nutrition with propolis and bee pollen supplements on bacteria colonization pattern in gastrointestinal tract of broiler chickens. **Animal Science and Biotechnologies**, v.45, n.1, p. 63-67, 2012.
- KUJUMGIEV, A; TSVETKOVA, I; SERKEDJIEVA, Y et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p. 235-240, 1999.
- LI, SP; ZHAO, XJ; WANG, JY. Synergy of *Astragalus* polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v.88, p. 519-525, 2009.
- LOFTY, M. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, p. 22-31, 2006.
- LU, J, IDRIS, U; HARMON, B et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p. 6816-6824, 2003.
- LUMPKINS, BS; BATAL, AB; LEE, M. The effect of gender on the bacterial community in the gastrointestinal tract of broilers. **Poultry Science**, v.87, p. 964-967, 2008.
- MANZ, W; AMANN, R; LUDWING, W et al. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, v.15, p. 593-600, 1992.
- MANZ, W; AMMAN, R; LUDWING, W et al. Application of a suite of 16S rRNA specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. **Microbiology**, v.142, p. 1097-1106, 1996.
- MEIER, H; AMANN, R; LUDWIG, W et al. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, p. 186-196, 1999.
- MITTELMAN, MW; HABASH, M; LACROIX, JM et al. Rapid detection of Enterobacteriaceae in urine by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization on membrane filters. **Journal of Microbiological Methods**, v.30, p. 153-160, 1997.
- MOHAMMADZADEH, S; SHARIATPANAH, M; HAMED, M et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chemistry**, v.103, p. 1097-1103, 2007.
- OLSEN, KN; HENRIKSEN, M; BISGAARD, M et al. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, p. 423-437, 2008.
- ORSI, RO; SFORCIN, JM; RALL, VLM et al. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.11, n.1, p. 109-116, 2005.
- PIERPOINT, WS. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v.244, p. 65-74, 2004.
- RASKO, DA; ROSOVITZ, MJ; MYERS, GS et al. The pangenome structure of *Escherichia coli*: Comparative genomic analysis of E-coli commensal and pathogenic isolates. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.20, p. 6881-6893, 2008.

- ROSTAGNO, HS; ALBINO, LFT; DONZELE, JL et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186p.
- SCAZZOCCHIO, F; D'AURIA, FD; ALESSANDRINI, D et al. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. **Microbiological Research**, v.161, p. 327-333, 2006.
- SINGLETON, VL; ROSSI Jr, JA. Colorimetry of total phenolics whit phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p. 144-158, 1965.
- TEKELI, A; KUTLU, HR; CELIK, L et al. Determination of the effects of *Z. officinale* and propolis extracts on intestinal microbiology and histological characteristics in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.9, p. 898-906, 2010.
- WILLIAMS, KP; GILLESPIE, JJ; SOBRAL, BWS et al. Phylogeny of *Gammaproteobacteria*. **Journal of Bacteriology**, v.192, n.9, p. 2305-2314, 2010.
- YANG, Y; IJI, PA; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poultry Science Journal**, v.65, p. 97-114, 2009.
- YEGANI, M; KORVER, DR. Factors affecting intestinal health in poultry. **Poultry Science**, v.87, p. 2052-2063, 2008.
- ZHU, XY; JOERGERT, RD. Composition of microbiota in content and mucus from caecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Poultry Science**, v.82, p. 1242-1249, 2003.
- ZHU, XY; ZHONG, T; PANDYA, Y et al. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.1, p. 124-137, 2002.
- ZOETENDAL, EG, BEN-AMOR, K; HARMSEN, HJM et al. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p. 4225-4232, 2002.

### **VIII - Microbiota cecal de frangos de corte alimentados com rações contendo própolis bruta mensurada por hibridização fluorescente *in situ***

**Resumo** – O objetivo deste estudo foi caracterizar a microbiota cecal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta por meio da hibridização fluorescente *in situ* e citometria de fluxo. Foram utilizados 168 pintos de corte, machos, criados em gaiolas de metabolismo até os 21 dias de idade. As aves foram distribuídas em um delineamento experimental inteiramente ao acaso, com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão da própolis (0, 100, 200, 300, 400 e 500 ppm), com sete repetições e quatro aves por unidade experimental. Os diferentes níveis de inclusão da própolis bruta proporcionaram efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) com relação ao grupo bacteriano *Clostridiaceae*, com menor porcentagem alcançada ao nível de 244 ppm. A população de *Lactobacillus* spp. e *Enterobacteriaceae* apresentaram aumento e decréscimo linear ( $P < 0,05$ ), respectivamente, de acordo com o aumento dos níveis. A porcentagem de ocorrência do grupo *Clostridiaceae* reduziu ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao tratamento controle nos animais alimentados com 100, 200, 300 e 400 ppm de própolis bruta. Em adição, o nível de 200 ppm ocasionou redução ( $P < 0,05$ ) na porcentagem de *Lactobacillus* spp. com relação ao tratamento controle. Para os grupos *Bacteroidaceae* e *Gammaproteobacteria* não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ). A suplementação de própolis bruta foi capaz de aumentar a população das bactérias estritamente benéficas e reduzir as potencialmente nocivas.

**Palavras-chave:** atividade antibacteriana, citometria de fluxo, hibridização *in situ* por fluorescência, população microbiana

## VIII - Cecal microbiota of broiler chickens fed with diets containing crude propolis measured by fluorescent *in situ* hybridization

**Abstract** – The present study aimed to characterize the cecal microbiota of broiler chickens fed with diets containing different levels of crude propolis by fluorescence *in situ* hybridization and flow cytometry. A total of 168 birds, raised in metabolism cages until the 21st day, were distributed in a completely randomized design to six treatments (crude propolis supplement levels of 0, 100, 200, 300, 400 and 500 ppm) and seven replicates and four birds per experimental unit. The different levels of inclusion of crude propolis gave a quadratic effect ( $P < 0.05$ ) for the bacterial group *Clostridiaceae*, with the lowest percentage found at the level of 244 ppm. The population of *Lactobacillus* spp. and *Enterobacteriaceae* showed linear increase and decrease ( $P < 0.05$ ), respectively, with increased crude propolis doses. There was a reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of occurrence of *Clostridiaceae* group to the inclusion level of 100, 200, 300 and 400 ppm of crude propolis when compared to control. In addition, the level of 200 ppm gave a reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of *Lactobacillus* spp. in relation to the control treatment. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in the *Bacteroidaceae* and *Gammaproteobacteria* group. The supplementation of crude propolis in diets was able to increase the strictly beneficial bacteria and reduce the potentially harmful.

**Key words:** antibacterial activity, flow cytometry, fluorescence *in situ* hybridization, microbial population

### Introdução

A manipulação da comunidade microbiana intestinal é um processo utilizado para garantir a saúde e ótimo desempenho dos animais, visto que estes organismos estão envolvidos em diversos eventos fisiológicos como desenvolvimento intestinal, nutrição e funções imunes (Gong et al., 2008).

Para evitar a ocorrência de impactos negativos sobre estes fatores, agentes antimicrobianos são comumente utilizados com função profilática e como moduladores de desempenho. No entanto, a partir da possibilidade de promoção de organismos resistentes a estas substâncias e que possam ser deletérios a saúde humana muitos países proibiram seu uso na alimentação animal (Dibner & Richards, 2005; Castanon, 2007).

Na tentativa de reduzir possível comprometimento no desempenho dos animais, com o ressurgimento de doenças infecciosas e consequentes perdas econômicas a busca por alternativas naturais é realidade constante na indústria avícola (Çetin et al., 2010). A própolis, produto resinoso, coletada de diversas fontes botânicas por abelhas melíferas é apontada como um suplemento alternativo pelas inúmeras substâncias biologicamente ativas (Krocko et al., 2012b), como ácidos aromáticos, ácidos diterpênicos, compostos fenólicos e preponderantemente flavonóides, considerado um dos principais responsáveis pelas atividades farmacológicas, dentre elas, a antibacteriana (Marcucci, 1995; Bankova et al., 2000).

Seus constituintes bioquímicos acima citados se encontram complexados na própolis bruta com diferentes materiais como cera e matéria orgânica, o que envolve algumas etapas de extração para isolamento e filtração dos mesmos (Burdock, 1998), sendo desta forma, a grande maioria das pesquisas com própolis focada na utilização de seus extratos. Assim, surge a possibilidade de substituir o extrato pela própolis *in natura*, antes do processamento, a fim de reduzir estes custos de produção.

Levando em consideração a atividade antibacteriana da própolis demonstrada em diversas pesquisas (Fernandes Jr., 2001, Rahman et al., 2010) e para que a própolis bruta seja utilizada como modulador de desempenho natural, detalhes sobre sua capacidade modulatória microbiana se faz necessário. Recentes avanços em técnicas moleculares têm tornado possível à identificação de populações bacterianas em amostras complexas independente dos processos de cultivo. Dentre as técnicas, destaca-se a hibridização fluorescente *in situ* que através de sondas baseadas na sequência

complementar de ácidos nucleicos são capazes de identificar e quantificar bactérias em diferentes níveis filogenéticos (Franks et al., 1998).

Desta forma, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota cecal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes níveis de inclusão de própolis bruta por meio da hibridização fluorescente *in situ* e citometria de fluxo.

### **Material e Métodos**

O experimento foi realizado no Setor de Avicultura da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Para o ensaio foram utilizadas 168 aves de corte de um dia de idade, machos, linhagem Cobb-Vantress, criadas em gaiolas de metabolismo até os 21 dias de idade. As gaiolas foram posicionadas dentro de um galpão convencional, com cobertura de telha fibrocimento, piso de concreto e paredes laterais de alvenaria com 0,40 metros de altura.

Durante os primeiros cinco dias de vida, os pisos das gaiolas foram forrados com papel kraft e trocados diariamente. As gaiolas foram equipadas com comedouros de cano de PVC e bebedouros tipo copo de pressão, os quais foram substituídos gradativamente por bebedouros automáticos tipo copo. Para o aquecimento inicial dos pintos foram utilizadas lâmpadas infravermelhas dispostas em um suporte de madeira posicionado na parte traseira das gaiolas.

As temperaturas médias, mínima e máxima, monitoradas diariamente dentro do galpão, foram respectivamente, de 26°C e 33°C e a umidade relativa média de 50%.

Foi utilizado um delineamento experimental inteiramente ao acaso com seis tratamentos, que consistiram em diferentes níveis de inclusão de própolis bruta (0; 100; 200; 300; 400 e 500 ppm) nas rações, com sete repetições e quatro aves por unidade experimental. O tratamento controle (0 ppm) não continha qualquer tipo de aditivo. O protocolo de experimentação animal utilizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 048/2010).

A própolis bruta utilizada foi adquirida em Maringá-PR e conservada em temperatura entre 2-8°C até o momento de utilização. A composição da própolis foi determinada de acordo com Singleton & Rossi (1965) e Pierpoint (2004) para polifenóis totais e utilizando o método colorimétrico cloreto de alumínio para o conteúdo de flavonoides totais.



As dietas experimentais foram formuladas para atender as exigências nutricionais propostas por Rostagno et al. (2005), para as fases de um a sete e oito a 21 dias de idade (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição percentual e calculada das rações experimentais.

Ingredientes (%)	Fases (dias)	
	1 a 7	8 a 21
Milho	56,38	59,26
Farelo de Soja, 45%	36,92	34,27
Óleo de Soja	1,99	2,30
Calcário	0,92	0,88
Fosfato Bicálcico	1,94	1,80
Sal	0,40	0,40
Inerte*	0,20	0,20
DL- Metionina, 98%	0,35	0,24
L- Lisina HCl, 78%	0,35	0,19
L- Treonina, 98%	0,15	0,05
Suplemento mineral e vitamínico <sup>1</sup>	0,40	0,40
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Valores calculados</b>		
PB (%)	22,04	20,79
EMA (kcal/kg)	2,950	3,000
Cálcio (%)	0,939	0,884
Fósforo disponível (%)	0,470	0,442
Met + Cis, dig (%)	0,944	0,814
Lisina, dig (%)	1,330	1,146
Treonina, dig (%)	0,865	0,745
Triptofano, dig (%)	0,213	0,183

<sup>1</sup>Suplemento vitamínico (conteúdo/kg de premix): Vit. A 2.916.670 UI/kg; Vit. D3 583.330 UI/kg; Vit. E 8.750 UI/kg; Vit. K3 433.33 mg/kg; Vit. B1 408.33 mg/kg; Vit. B2 1.333,33 mg/kg, Vit. B12 4.166,67 mcg/kg; Niacina 8.983,33 mg/kg; Pantotenato de cálcio 3.166,67 mg/kg; Ácido Fólico 200 mg/kg; Biotina 25 mg/kg. Suplemento Mineral (conteúdo/kg de premix): Ferro 12.6 g/kg; Cobre 3.072 mg/kg; Iodo 248 mg/kg; Zinco 12.6 g/kg; Mangânes 15 g/kg; Selênio 61.20 mg/kg; Cobalto 50.40 mg/kg.

\* A própolis bruta foi adicionada as rações em substituição ao inerte.

Aos 21 dias de idade, cinco aves representando a média de peso do tratamento ( $\pm 5\%$ ) foram selecionadas aleatoriamente para caracterização da microbiota intestinal. As aves foram insensibilizadas por choque elétrico e sacrificadas para remoção dos cecos que foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o processamento. Posteriormente, obteve-se o conteúdo cecal e cada amostra foi diluída em solução estoque estéril (1% peptone, 15% glicerol em água) na proporção de 1:10, sendo novamente estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A fixação das células foi realizada de acordo com metodologia proposta por Amann et al. (1990). Para tanto, um volume de suspensão celular foi homogeneizado com três volumes de solução de formaldeído (4% em PBS) e incubado a  $4^{\circ}\text{C}$  por 16

horas. A amostra foi então centrifugada por dois minutos a 12000 rpm, ressuspensa em 500 µl de PBS e novamente centrifugada. O pellet formado foi ressuspensa em 500 µl de PBS e 500 µl de álcool absoluto. A estocagem do material foi realizada a -20°C até o processo de hibridização ser realizado.

A hibridização das células fixadas foi realizada adaptando o protocolo previamente publicado por Zoetendal et al. (2002). Para cada hibridização 200 µl de suspensão de células foi centrifugada a 12000 rpm por três minutos e ressuspensa em 100 µl de solução de hibridização (0,9M NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,1% [peso/volume] SDS) e adicionado respectivamente sondas com fluorocromo Cy-5 (100 ng/µl) (Tabela 2). As amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C no escuro, em forno de hibridização. Após este período, 900 µl de solução tampão baixa concentração salina pré-aquecida (0,225 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA) foi adicionada as amostras e incubado a 50°C por cinco minutos e ressuspensa novamente na solução tampão baixa concentração salina pré-aquecida, sendo este procedimento realizado por duas vezes adicionais. Após este processamento, as células foram centrifugadas a 12000 rpm por cinco minutos e ressuspensas em um mL de solução PBS gelada (pH 8,4).

Tabela 2 – Sondas utilizadas para processo de hibridização fluorescente *in situ*.

Sonda	Sequência (5' – 3')	Grupo alvo	Referência
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	<i>Bacteria</i>	Amann et al. (1990)
LGC354A	TGGAAGATTCCTACTGC	<i>Lactobacillus</i> spp.	Meier et al. (1999)
Chis150	TTATGCGGTATTAATCTYCCTTT	<i>Clostridiaceae</i>	Franks et al. (1998)
Entbac	CATGAATCACAAAGTGGTAAG	<i>Enterobacteriaceae</i>	Mittelman et al. (1997)
Gam42a	GCCTTCCCACATCGTTT	<i>Gammaproteobacteria</i>	Manz et al. (1992)
Bac 303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Bacteroidaceae</i>	Manz et al. (1996)

As amostras foram analisadas utilizando o aparelho citômetro de fluxo (FACScalibur) e as proporções de células hibridizadas com as sondas foram calculadas contra 10.000 eventos. Esta proporção foi corrigida subtraindo a proporção encontrada em amostras hibridizadas sem sondas. A porcentagem de bactéria foi calculada considerando a proporção encontrada com a sonda Eub338 como sendo o total de bactéria (100%). Todas as análises foram realizadas em triplicata para cada sonda utilizada.

Como procedimento estatístico, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância e regressão polinomial por intermédio do programa SAEG – Sistemas de Análises Estatísticas e Genéticas (UFV, 1997). Para comparação de resultados entre o tratamento controle com cada um dos níveis de inclusão de própolis bruta foi utilizado o teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

### **Resultados e Discussão**

A própolis bruta utilizada neste experimento apresentou concentração de 78,75 mg/L de polifenóis totais e 11,95 mg/L de flavonoides totais. A composição química da própolis pode variar conforme a flora utilizada em sua elaboração, período de colheita, características climáticas da região e genética das abelhas (Bankova, 2005), sendo que o controle de sua qualidade é através da determinação da concentração destes compostos (Fu et al., 2005). No entanto, independente desta variação, as atividades farmacológicas estão presentes, pois este ingrediente é produzido para desempenhar estas atividades proporcionando um ambiente asséptico no interior das colmeias (Salatino et al., 2005; Trusheva et al., 2006).

A caracterização da microbiota foi focada na determinação de cinco grupos, *Lactobacillus* spp representando as bactérias estritamente benéficas, *Bacteroidaceae* as potencialmente benéficas e *Clostridiaceae*, *Gammaproteobacteria* e *Enterobacteriaceae* as potencialmente nocivas. As bactérias reconhecidas pela sonda Entbac também são identificadas pela Gam42a, fazendo parte desta classe de bactérias gram-negativas.

Os diferentes níveis de inclusão da própolis bruta proporcionaram efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) com relação ao grupo bacteriano *Clostridiaceae*, com menor porcentagem alcançada ao nível de 244 ppm. Quando comparado cada nível de inclusão com o tratamento controle, observou-se diminuição da porcentagem do grupo *Clostridiaceae* ( $P < 0,05$ ) nos animais alimentados com 100, 200, 300 e 400 ppm de própolis bruta. A ação da própolis bruta também foi observada para o grupo *Enterobacteriaceae* ocorrendo decréscimo linear ( $P < 0,05$ ) de acordo com o aumento dos níveis.

Em adição, observou-se aumento linear ( $P < 0,05$ ) para a população de bactérias estritamente benéficas *Lactobacillus* spp. com o aumento dos níveis de inclusão de própolis bruta. Entretanto, o nível de 200 ppm ocasionou diminuição ( $P < 0,05$ ) na

porcentagem deste grupo quando comparado ao tratamento controle. Quanto aos demais grupos bacterianos não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3 – Grupos bacterianos (% da contagem apresentada pela sonda Eub338) ( $\pm$  erro padrão) em amostras do ceco de frangos de corte com 21 dias de idade alimentados com dietas contendo diferentes níveis de própolis bruta.

Níveis de própolis bruta	Chis 150 <sup>1</sup>	Bac 303 <sup>2</sup>	LGC354A <sup>3</sup>	Gam42a <sup>4</sup>	Entbac <sup>5</sup>
Controle	6.65 $\pm$ 0.87	5.42 $\pm$ 0.89	4.34 $\pm$ 0.42	12.67 $\pm$ 1.81	2.59 $\pm$ 0.46
100 ppm	3.92 $\pm$ 0.74*	3.78 $\pm$ 0.88	3.00 $\pm$ 0.38	9.84 $\pm$ 1.35	3.37 $\pm$ 0.60
200 ppm	1.60 $\pm$ 0.31*	2.82 $\pm$ 0.45	2.60 $\pm$ 0.54*	9.46 $\pm$ 1.94	3.58 $\pm$ 0.58
300 ppm	2.70 $\pm$ 0.53*	5.66 $\pm$ 0.76	3.77 $\pm$ 0.78	8.91 $\pm$ 1.65	2.01 $\pm$ 0.31
400 ppm	3.96 $\pm$ 0.70*	4.97 $\pm$ 1.03	3.81 $\pm$ 0.65	10.47 $\pm$ 1.78	1.26 $\pm$ 0.20
500 ppm	7.58 $\pm$ 1.17	4.51 $\pm$ 0.71	4.98 $\pm$ 0.35	12.76 $\pm$ 1.03	2.88 $\pm$ 0.66
CV (%)	36.50	40.16	30.45	30.15	38.08
Regressão	Quadrática <sup>6</sup>	ns	Linear <sup>7</sup>	ns	Linear <sup>8</sup>

<sup>1</sup> Clostridiaceae

<sup>2</sup> Bacteroidaceae

<sup>3</sup> Lactobacillus spp.

<sup>4</sup> Gammaproteobacteria

<sup>5</sup> Enterobacteriaceae

<sup>6</sup>  $Y = 7,13193 - 0,0423073x + 0,0000865522x^2$  ( $R^2 = 0,97$ ); ( $P=0,0004$ ); Ponto de mínima: 244 ppm

<sup>7</sup>  $Y = 2,15138 + 0,00496379x$  ( $R^2 = 0,79$ ); ( $P=0,008$ )

<sup>8</sup>  $Y = 3,72107 - 0,00385918x$  ( $R^2 = 0,37$ ); ( $P=0,03$ )

\* Significativo pelo teste de Dunnett ( $P<0,05$ )

ns = não significativo

A suplementação de própolis bruta demonstrou ser capaz de estimular o desenvolvimento das bactérias estritamente benéficas conjuntamente com redução daquelas potencialmente nocivas. Esta modulação benéfica da microbiota tem sido encontrada por diversos autores que vêm estudando ingredientes naturais (Li et al., 2009; Kim et al., 2011; Viveros et al., 2011) na alimentação de frangos de corte. Em adição, os resultados encontrados estão de acordo com estudos realizados com frangos de corte utilizando extrato etanólico de própolis, onde com níveis de 400 ppm e 1000 ppm, Tekeli et al. (2010) e Krocko et al. (2012a) observaram efeito semelhante.

Assim, o estabelecimento de uma maior proporção de bactérias benéficas pode ser responsável por um melhor status de saúde do animal por propiciar aumento na produção de vitaminas, estimular o sistema imune e inibir o crescimento e estabelecimento de bactérias patogênicas (Jeurissen et al., 2002).

Apesar da complexidade com relação à composição bacteriana cecal a técnica de hibridização fluorescente *in situ* aliada a citometria de fluxo se mostraram eficazes na identificação e quantificação dos grupos escolhidos. Os resultados encontrados estão de

acordo com dados publicados utilizando o mesmo protocolo de análise (Eyng et al., 2011).

A diversidade da microbiota cecal vem sendo extensivamente estudada, no entanto, ainda são contraditórios com relação à predominância de determinados grupos. Lu et al. (2003) revelaram maior porcentagem de sequências gênicas com relação aos *Clostridiaceae*, seguidos por *Fusobacterium*, *Lactobacillus* e *Bacteroides*. Já Dumonceaux et al. (2006) observaram maior concentração de bactérias da ordem *Clostridiales* seguidos do filo *Bacteroidetes* na microbiota cecal de frangos de corte. As modificações observadas com relação a esta diversidade na comunidade microbiana do trato gastrointestinal reflete a interferência dos diversos fatores, como a dieta (Apajalahti et al., 2004), aditivos (Netherwood et al., 1999) idade (Lu et al., 2003) e sexo (Lumpkins et al., 2008) dos animais.

O efeito antimicrobiano da própolis é correlacionado com a sua complexa composição química (Abd El Hady & Hegazi, 2002) possuindo ações bacteriostáticas e bactericidas, inibindo a aderência de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal (Selma et al., 2009) e desnaturando proteínas na parede celular bacteriana aumentando sua permeabilidade aos fluidos intracelulares ocasionando sua eliminação (Tekeli et al., 2010). Além deste efeito, cita-se como provável estímulo sobre o crescimento das bactérias benéficas pelo fato destes microrganismos serem capazes de metabolizar os compostos fornecendo energia suplementar às células (García-Ruíz et al., 2008).

Tem sido demonstrado que a própolis pode influenciar de maneira diferenciada as bactérias considerando a classificação gram, sendo as bactérias gram-negativas mais resistentes a ação antibacteriana da própolis (Gonsales et al., 2006; Rahman et al., 2010; Hendi et al., 2011), possivelmente pela maior complexidade de sua parede celular que pode inibir e/ou retardar a penetração das substâncias (Tegos et al., 2002). No entanto, o processo de extração dos compostos pode ser o responsável por esta diferenciada atividade antibacteriana (Muli & Maingi, 2007). Sendo assim, a ação conjunta contra bactérias gram-negativas e gram-positivas observada no presente estudo pode ser pela utilização da própolis na forma bruta, sem processamento.

Os resultados obtidos neste trabalho reforçam a importância da própolis e seus constituintes com atividade antibacteriana na alimentação animal. Demonstrando a capacidade da própolis, mesmo sem processamento, em modular beneficemente a microbiota cecal de frangos de corte, reduzindo os custos destinados a extração destes

compostos biologicamente ativos da própolis *in natura*. Esta nova abordagem sobre este ingrediente auxiliará na busca por ingredientes alternativos capazes de substituir os antibióticos.

### **Conclusão**

A suplementação de própolis bruta nas dietas foi capaz de aumentar a população de bactérias estritamente benéficas e reduzir as potencialmente nocivas.

### Referências

- ABD EL HADY, FK; HEGAZI, AG. Egyptian propolis: 2. chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. **Verlag der Zeitschrift für Naturforsch**, v.57c, p. 386-394, 2002.
- AMANN, RI; BINDER, BJ; OLSON, RJ et al. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. **Applied and Environmental Microbiology**, v.56, n.6, 1990.
- APAJALAHTI, J; KETTUNEN,A; GRAHAM, H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. **World's Poultry Science Journal**, v.60, p. 223-232, 2004.
- BANKOVA, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.2, n.1, p. 29-32, 2005.
- BANKOVA, V; CASTRO, SL; MARCUCCI, MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p. 3-15, 2000.
- BURDOCK, GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, p. 347-363, 1998.
- CASTANON, JIR. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. **Poultry Science**, v.86, p. 2466-2471, 2007.
- ÇETIN,E; SILICI, S; ÇETIN, N et al. Effects of diets containing different concentrations of propolis on hematological and immunological variables in laying hens. **Poultry Science**, v.89, p. 1703-1708, 2010.
- DIBNER, JJ; RICHARDS, JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, v.84, p. 634-643, 2005.
- DUMONCEAUX, TJ; HILL, JE; HEMMINGSEN, SM et al. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.4, p. 2815-2823, 2006.
- EYNG, C; PEDROSO, AA; LEE, MD. Characterization of the intestinal microbiota of chickens with deprived growth. **Poultry Science**, v.90 (E-Suppl. D), 2011.
- FERNANDES JR, A; LEOMIL, L; FERNANDES, AAH et al. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v.7, n.2, p. 173-182, 2005.
- FRANKS, AH; HARMSSEN, HJ, RAANGS, GC et al. Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Applied Environmental Microbiology**, v.64, p. 3336-3345, 1998.
- FU, S; YANG, M; WEN, H et al. Analysis of flavonoids in propolis by capillary electrophoresis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.13, n.1, p. 43-50, 2005.
- GARCÍA-RUIZ, A; BARTOLOMÉ, B; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, AJ et al. Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. **Food Control**, v.19, p. 835-841, 2008.
- GONG, J; YU, H; LIU, T et al. Effects of zinc bacitracin, bird age and access to range on bacterial microbiota in the ileum and caeca of broiler chickens. **Journal of Applied Microbiology**, v.104, p. 1372-1382, 2008.
- GONSALES, GZ; ORSI, RO; FERNANDES JR, A et al. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. . **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.12, n.2, p. 276-284, 2006.
- HENDI, NKK; NAHER, HS; AL-CHARRAKH, AH. *In vitro* antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.20, p. 5058-5066, 2011.

- JEURISSEN, SHM; LEWIS, F; VAN DER KLIS, JD et al. Parameters and techniques to determine intestinal health of poultry as constituted by immunity, integrity, and functionality. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.3, p. 1-14, 2002.
- KIM, GB; SEO, YM; KIM, CH et al. Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. **Poultry Science**, v.90, p. 75-82, 2011.
- KROCKO, M; CANIGOVÁ, M; BEZEKOVÁ, J et al. Effect of nutrition with propolis and bee pollen supplements on bacteria colonization pattern in gastrointestinal tract of broiler chickens. **Animal Science and Biotechnologies**, v.45, n.1, p. 63-67, 2012a.
- KROCKO, M; LAVOVÁ, M; BEZEKOVÁ, J et al. Antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens after propolis and bee pollen addition. **Animal Science and Biotechnologies**, v.45, n.1, p. 58-62, 2012b.
- LI, SP; ZHAO, XJ; WANG JY. Synergy of *Astragalus* polysaccharides and probiotics (*Lactobacillus* and *Bacillus cereus*) on immunity and intestinal microbiota in chicks. **Poultry Science**, v.88, p. 519-525, 2009.
- LU, J; IDRIS, U; HARMON, B et al. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. **Applied and Environmental Microbiology**, v.69, n.11, p. 6816-6824, 2003.
- LUMPKINS, BS; BATAL, AB; LEE, M. The effect of gender on the bacterial community in the gastrointestinal tract of broilers. **Poultry Science**, v.87, p. 964-967, 2008.
- MANZ, W; AMANN, R; LUDWING, W et al. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. **Systematic and Applied Microbiology**, v.15, p. 593-600, 1992.
- MANZ, W; AMMAN, R; LUDWING, W et al. Application of a suite of 16S rRNA specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. **Microbiology**, v.142, p. 1097-1106, 1996.
- MARCUCCI, MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, v.26, n.2, p.83-99, 1995.
- MEIER, H; AMANN, R; LUDWIG, W et al. Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of gram-positive bacteria with low DNA G + C content. **Systematic and Applied Microbiology**, v.22, p. 186-196, 1999.
- MITTELMAN, MW; HABASH, M; LACROIX, JM et al. Rapid detection of Enterobacteriaceae in urine by fluorescent 16S rRNA in situ hybridization on membrane filters. **Journal of Microbiological Methods**, v.30, p. 153-160, 1997.
- MULI, EM; MAINGI, JM. Antibacterial activity of *Apis mellifera* L. propolis collected in three regions of Kenya. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.13, n.2, p. 655-663, 2007.
- NETHERWOOD, T; GILBERT, HJ; PARKER, DS et al. Probiotics shown to change bacterial community structure in the avian gastrointestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v.65, n.11, p. 5134-5138, 1999.
- PIERPOINT, WS. The extraction of enzymes from plant tissues rich in phenolic compounds. **Methods in Molecular Biology**, v.244, p. 65-74, 2004.
- RAHMAN, MM; RICHARDSON, A; SOFIAN-AZIRUN, M. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research**, v.4, n.16, p. 1872-1878, 2010.
- ROSTAGNO, HS; ALBINO, LFT; DONZELE, JL et al. Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Zootecnia, 2005. 186p.



- SALATINO, A; TEIXEIRA, EW; NEGRI, G et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.2, n.1, p. 33-38, 2005.
- SELMA, MV; ESPÍN, JC; TOMÁS-BARBERÁN, FA. Interaction between phenolic and gut microbiota: role in human health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, p. 6485-6501, 2009.
- SINGLETON, VL; ROSSI Jr, JA. Colorimetry of total phenolics whit phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p. 144-158, 1965.
- TEGOS, G; STERMITZ, FR; LOMOVSKAYA, O et al. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 3133-3141, 2002.
- TEKELI, A; KUTLU, HR; CELIK, L et al. Determination of the effects of *Z. officinale* and propolis extracts on intestinal microbiology and histological characteristics in broilers. **International Journal of Poultry Science**, v.9, n.9, p. 898-906, 2010.
- TRUSHEVA, B; POPOVA, M; BANKOVA, V et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine – eCAM**, v.3, n.2, p. 249-254, 2006.
- VIVEROS, A; CHAMORRO, S; PIZARRO, M et al. Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. **Poultry Science**, v.90, p. 566-578, 2011.
- ZOETENDAL, EG, BEN-AMOR, K; HARMSSEN, HJM et al. Quantification of uncultured *Ruminococcus obeum*-like bacteria in human fecal samples by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry using 16S rRNA-targeted probes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.9, p. 4225-4232, 2002.

## **IX – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A suplementação dietética de própolis bruta e extrato etanólico de própolis influenciou de maneira diferenciada os parâmetros de desempenho produtivo, imunológicos e microbiológicos. Provavelmente os níveis necessários para influenciar parâmetros produtivos são superiores aos necessários para aumentar as respostas imunes e modular a microbiota cecal dos animais.

O extrato etanólico de própolis influenciou de maneira negativa o desenvolvimento dos animais na primeira semana de vida podendo ter comprometido os resultados nas demais fases de criação, evidenciando que os níveis utilizados devem ser repensados para esta fase. Cabe a sugestão de liofilizar o extrato etanólico de própolis, sendo utilizado na forma seca, facilitando a inclusão do ingrediente as rações.

Para a própolis bruta, apesar de não ter sido realizado nenhum processo de beneficiamento, esta mostrou ser capaz de influenciar enzimas digestivas, parâmetros imunológicos e microbiológicos, sendo considerada desta forma, passível de ser utilizada nas rações animais. No entanto, com relação aos parâmetros produtivos caso a inclusão da própolis bruta ocorresse na dieta de crescimento, é provável que melhorasse o desempenho aos 42 dias, como indicado pelo maior rendimento de carcaça nos animais alimentados com própolis bruta. Assim, sugere-se experimento com inclusão deste ingrediente durante o período total de criação (1-42 dias).

Apesar de ambos os aditivos não terem sido capazes de aumentar o desempenho dos animais, mostraram-se eficientes na melhora das respostas imunes humoral e celular. O extrato etanólico foi capaz de aumentar a produção de anticorpos frente ao estímulo da vacinação, podendo ser utilizado como um adjuvante nessa prática. Já a própolis bruta aumentou a resposta imune mediada por células, porém, acredita-se que

como os compostos podem ter sido disponibilizados em pequena quantidade a estimulação sobre a resposta imune humoral poderia ter ocorrido mais tardiamente.

Considerando os resultados positivos obtidos com relação aos parâmetros imunitários, sugerem-se pesquisas envolvendo a suplementação destes ingredientes em rações de matrizes, verificando a possibilidade da interferência sobre a imunidade inata dos animais.