

## Ação do Extrato de Própolis sobre a Fermentação *in vitro* de Diferentes Alimentos pela Técnica de Produção de Gases<sup>1</sup>

Deolindo Stradiotti Júnior<sup>2</sup>, Augusto Cesar de Queiroz<sup>3</sup>, Rogério de Paula Lana<sup>3</sup>, Cristiana Gama Pacheco<sup>4</sup>, Maíra Machado Leal Camardelli<sup>5</sup>, Edenio Detmann<sup>5</sup>, Eduardo da Costa Eifert<sup>6</sup>, Poliana Mary Magalhães Nunes<sup>5</sup>, Marcus Vinícius Moraes de Oliveira<sup>6</sup>

**RESUMO** - Dois experimentos foram realizados procurando-se avaliar *in vitro* a eficiência do extrato de própolis em inibir a produção de gases oriundos da fermentação ruminal de diferentes alimentos. No primeiro experimento, incubaram-se 100 mg de matéria seca de feno de brachiária moído, em ausência (0,2 mL de solução alcoólica a 70% em água) ou presença de 0,2 mL de extrato de própolis (extração de 3 g de própolis em pedra triturada para cada 10 mL de álcool a 70%, durante dez dias, posteriormente diluída para 50% da mesma). O extrato de própolis, quando comparado ao tratamento controle, reduziu a produção final total e a produção final de gases para carboidratos fibrosos. A taxa de digestão específica para carboidratos fibrosos e carboidratos não-fibrosos foi superior, quando se utilizou o extrato de própolis. A redução da produção total de gases pode ser atribuída ao efeito da própolis em aumentar a concentração molar de propionato, com conseqüente diminuição da relação acetato:propionato. No experimento 2, procurou-se avaliar diferentes diluições de extrato de própolis (0; 13,7; 33,3; e 66,7%), em analogia à monensina sódica, adicionada para atingir 5,0 µM como concentração final nos tubos de incubação. Observou-se efeito significativo de tratamento, alimento e interação alimento:tratamento sobre o volume de gás proveniente dos carboidratos fibrosos e não-fibrosos. Não houve efeito do menor nível de própolis (13,7%) sobre nenhuma das dietas avaliadas, tanto para volume final de gases oriundos dos carboidratos fibrosos quanto não-fibrosos. Entretanto, o maior nível (66,7%) mostrou-se eficiente em todas as dietas, para ambos os carboidratos, inclusive suplantando a monensina, na maioria das vezes, quanto à menor produção final de gases.

Palavras-chave: fermentação ruminal, gases, ionóforos, própolis

## Effect of the Propolis on the *in vitro* Fermentation of Different Feedstuffs by the Technique of Gas Production

**ABSTRACT** - Two experiments were accomplished with the objective to evaluate the *in vitro* efficiency of the propolis extract to inhibit the gas production from ruminal fermentation of different feeds. In the first experiment, 100 mg of ground brachiaria dry matter hay was incubated, in absence (0.2 mL of alcoholic solution at 70.0% in water) or presence of 0.2 mL of propolis extract (extraction of 3 g of propolis in triturated stone for each 10 mL of alcohol at 70%, for ten days, later on diluted for 50% of the same). The propolis extract, when compared to the control treatment, reduced the final total production and the final gas production for fiber carbohydrates. The specific digestion rate for fiber carbohydrates and non fiber carbohydrates was superior when the propolis extract was used. The reduction of the total gas production could be attributed to the effect of the propolis in increasing the molar propionate concentration, with consequent decrease of the acetate:propionate ratio. In the experiment 2, the objective was to evaluate different dilutions of the propolis extract (0.0, 13.7, 33.3, and 66.7%), in analogy to sodium monensin, added to reach 5.0 mM as a final concentration in the incubation tubes. It was observed significant effect of treatment, feed and feed:treatment interaction on the gas volume from the fiber and non fiber carbohydrates. There was no effect of the smallest propolis level (13.7%) on none of the evaluated diets, for final gas volume as for the fiber as non fiber carbohydrate. However, the largest level (66.7%) was efficient for all diets, for both types of carbohydrates, in addition to supplanting the monensin most of the time producing the least amount of gas.

Key Words: gas, ionophore, propolis, ruminal fermentation

<sup>1</sup> Parte da tese de Doutorado do primeiro autor, parcialmente financiada pelo CNPq.

<sup>2</sup> Zootecnista, DS em Nutrição de Ruminantes - DZO/UFV; Professor Titular de Nutrição Animal, IESSES - Instituto de Ensino Superior do Espírito Santo - Faculdade Castelo - ES. E-mail: jrstradiotti@terra.com.br

<sup>3</sup> Professor do Departamento de Zootecnia da UFV, Viçosa-MG, 36571-000; Bolsista do CNPq.

<sup>4</sup> Bióloga, Professora do Departamento de Ciências Agrárias, IESSES - Instituto de Ensino Superior do Espírito Santo - Faculdade Castelo - ES.

<sup>5</sup> Zootecnista, Mestrando em Zootecnia - DZO/UFV.

<sup>6</sup> Doutor em Nutrição de Ruminantes - DZO/UFV.

## Introdução

Em ruminantes, a fermentação de alimentos ingeridos produz ácidos graxos voláteis (AGVs), amônia, gases (dióxido de carbono e metano) e células microbianas. Para o ruminante, os AGVs constituem a maior fonte de energia (65 a 75% da energia metabolizável ingerida). Entretanto, a produção de dióxido de carbono e metano, representa grande perda de energia ingerida no alimento. Segundo Lana et al. (1998), a produção de gás metano pelas bactérias ruminais e intestinais (*Methanobrevibacter* spp. e *Methanomicrobium mobile*) corresponde a uma perda energética de até 13% em relação à energia do alimento ingerido. Em adição, o gás metano, que é eliminado pelos ruminantes, por eructação, é um dos principais responsáveis pelo efeito estufa e pela destruição da camada de ozônio da atmosfera. Deve-se considerar que um bovino adulto chega a produzir mais de 400 litros de gás por dia (metano + dióxido de carbono), liberado no meio, principalmente por eructação; atualmente, o rebanho bovino mundial é constituído de mais de 1 bilhão de cabeças (ANUALPEC 2001). Conforme Crutzen et al. (1986), os ruminantes são responsáveis por 15% da emissão total de metano na atmosfera terrestre. Madigan et al. (1997) alertaram para o fato de os ruminantes serem os animais que mais contribuem para a emissão de metano na atmosfera.

Essa produção de gases no rúmen está intimamente relacionada com a produção de AGVs. A fermentação de carboidratos e proteínas, que resulta em produção de AGVs no rúmen, é acompanhada pela produção de hidrogênio. Somente pequena parte deste hidrogênio é usada para crescimento microbiano e saturação de ácidos graxos de cadeia longa, sendo a maior parte utilizada por bactérias metanogênicas para produção de metano.

Manipulações da fermentação ruminal que priorizem o aumento da produção de propionato, a exemplo de aditivos ionóforos, implicam, conseqüentemente, na diminuição da produção de metano no rúmen, devido à existência, no ecossistema ruminal, de uma relação inversa entre a produção de metano e de ácido propiônico. O mecanismo pelo qual se justifica essa relação inversa consiste em direcionar os hidrogênios e carbonos que estariam disponíveis para metanogênese, excedentes na produção de acetato, para a produção de propionato. Logo, uma das formas de atuação dos ionóforos seria inibir a

ação das bactérias gram-positivas produtoras de acetato, mas não o crescimento das bactérias gram-negativas produtoras de succinato e propionato (Russel & Strobel, 1989). Isto acarretaria diminuição na relação acetato:propionato no rúmen, promovendo redução na produção de metano e, conseqüentemente, aumentando a eficiência energética dos ruminantes.

Diversos trabalhos têm demonstrado que a atividade antimicrobiana da própolis ocorre pela inibição de bactérias classificadas como gram-positivas (Ghisalberti, 1979; Langoni et al., 1994; Vargas et al., 1994; Goulart, 1995; Bankova et al., 1996; Park et al., 1998; Park et al., 2000; Pinto, 2000). No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação envolvidos, mas possivelmente seus efeitos sejam similares aos observados para os ionóforos por também alterarem a permeabilidade da membrana bacteriana, alterando o fluxo de íons através desta (Mirzoeva et al., 1997). Assim, objetivou-se, neste trabalho, avaliar a eficiência da própolis em diminuir a produção de gases de três relações volumoso:concentrado incubadas *in vitro*.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Setor de Bovinos e as análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Microbiologia de Anaeróbios do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG.

A cidade de Viçosa localiza-se na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais, a 20°45' de Latitude Sul e 42°51' de Longitude Oeste e a altitude de 649m. De acordo com dados fornecidos pelo Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, o clima de Viçosa é subtropical, com inverno frio e seco e verão quente e úmido, sendo classificado como Cwa subtropical. Apresenta precipitação pluviométrica anual média de 1342 mm, sendo que 80% das chuvas caem entre os meses de outubro a março, período chuvoso, e os 20% restantes, entre os meses de abril a setembro, período seco. A temperatura média das máximas é de 26,1°C; a média das mínimas, de 14°C; e a umidade relativa do ar, de 80%.

Inicialmente, procurou-se determinar, *in vitro*, a produção de gases pelos microrganismos ruminais na ausência ou presença de própolis.

Para obtenção do extrato de própolis, utilizaram-se 30 g de própolis bruta triturada para cada 100 mL de

solução alcoólica hidratada (70%), por um período de 10 dias. Em seguida, foi feita a filtragem em papel-filtro, obtendo-se a solução-estoque.

Foi utilizado o líquido de rúmen de um animal recebendo forragem, coletado duas horas após o arraçoamento, filtrado em quatro camadas de gaze e transportado anaerobicamente para o laboratório. Na seqüência, o líquido foi transferido para um erlenmeyer e mantido a 39°C, sob anaerobiose, para a separação da fase líquida intermediária (inóculo contendo bactérias), dos protozoários e das partículas dos alimentos (fases mais densa e sobrenadante, respectivamente).

O preparo da amostra para a incubação *in vitro*, pela técnica de produção de gases, foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Cabral et al. (2000), tomando-se 8,0 mL de solução-tampão de McDougal, 2,0 mL de inóculo e 0,2 mL de solução alcoólica a 70% ou da solução-estoque de própolis, sendo esta última diluída para 50% da mesma.

Todo o material foi adicionado em frascos de vidro de 50 mL, em triplicata, ambientados com CO<sub>2</sub>, tampados com rolhas de borracha e lacres de alumínio, mantidos em uma sala climatizada, com temperatura constante de 39°C, em mesa de agitação orbital a 44 rpm. O alimento incubado foi o feno de brachiária (100 mg de feno triturado).

As leituras da pressão e volume dos gases foram realizadas por meio de um manômetro (0-1 kgf/cm<sup>2</sup>) acoplado a uma seringa (20 mL), conforme descrito por Malafaia et al. (1998), nos seguintes tempos: 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 60 e 72 horas após o início da incubação. Para descontar o volume de gás oriundo do líquido de rúmen e da solução-tampão, dois frascos foram incubados sem amostra (branco); dessa forma, para cada tempo de leitura, o volume de gás dos frascos com amostra foi subtraído do volume dos frascos sem amostra. Com o somatório do volume de gás para cada tempo de leitura, foram estabelecidas as curvas de produção cumulativa dos gases. A cinética da produção cumulativa dos gases foi analisada empregando-se o modelo logístico bicompartimental (Schofield et al., 1994):

$$V_t = V_{f_1} \{1 + \exp[2 + 4 \frac{\mu m_1}{V_{f_1}} (L - t)]\}^{-1} + V_{f_2} \{1 + \exp[2 + 4 \frac{\mu m_2}{V_{f_2}} (L - t)]\}^{-1}$$

em que:  $V_t$  = volume acumulado de gases no tempo "t" (mL);  $V_f$  = volume total de gases produzido em  $t \rightarrow \infty$  (mL);  $\mu m$  = taxa máxima de produção de gases (mL/h);  $L$  = latência (h);  $t$  = tempo após o início da incubação (h); e "1" e "2" (subscritos) = indicadores

referentes à cinética de produção de gases a partir de CF e CNF, respectivamente.

A razão  $\mu m/V_f$ , cuja unidade h<sup>-1</sup>, representa a taxa específica de digestão ( $k_d$ ) do substrato (Schofield et al., 1994). Neste estudo, foi admitida como similar à taxa específica de crescimento microbiano, pressupondo-se relação diretamente proporcional entre o volume de gás produzido, a produção microbiana e o substrato digerido.

Na seqüência, em um segundo experimento, procurou-se determinar a produção de gases *in vitro*, em função dos diferentes níveis de própolis e concentrado na dieta.

O preparo da amostra para a incubação *in vitro* foi similar ao descrito anteriormente, tomando-se 8,0 mL de solução tampão de McDougall, 2,0 mL de inóculo e 0,2 mL de solução alcoólica a 70% ou da solução estoque de própolis, sendo esta última diluída em três níveis (16,7; 33,3; e 66,7%). Nos tratamentos contendo a monensina, esta foi adicionada para que se atingisse 5,0  $\mu$ M como concentração final nos tubos de incubação.

Os seguintes alimentos foram incubados, procurando-se perfazer um total de 50 mg de NDT na dieta: 100 mg de gramínea fresca picada (Dieta 1); 50 mg gramínea fresca picada + 31,5 mg de amido de milho (Dieta 2); e 63 mg de amido de milho (Dieta 3).

As leituras de pressão e volume dos gases foram realizadas conforme descrito anteriormente.

Para o ajuste dos modelos, foi utilizado o processo iterativo do algoritmo de Marquadt, implantado no software Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG (Euclides, 1993).

## Resultados e Discussão

Verifica-se, na Tabela 1, que o extrato de própolis, quando comparado ao tratamento controle (solução alcoólica a 70%), reduziu a produção final total e a produção final de gases para carboidratos fibrosos. Observa-se, ainda, que a taxa de digestão específica para carboidratos fibrosos e carboidratos não-fibrosos foi superior, quando se utilizou o extrato de própolis. Assumindo a pressuposição de Schofield et al. (1994) de que a taxa de digestão específica (taxa de produção de gás) se correlaciona de forma direta e positiva com a taxa de crescimento microbiano, pode-se inferir que a própolis estimulou o crescimento microbiano.

A redução no volume final de gases foi atribuída, provavelmente, ao fato de a própolis ter possibilitado

a “conservação de carbono no meio”. Essa conservação de carbono no rúmen, em linhas gerais, é decorrência do aumento da concentração molar de propionato (3 carbonos) no rúmen, em detrimento de diminuição da concentração de acetato (2 carbonos). Neste sentido, a própolis pode ter atuado como uma substância ionófora. Os ionóforos apresentam a propriedade de causar mudanças na relação entre esses dois ácidos, seja pela atuação inibitória sobre as bactérias fermentadoras de celulose, produtoras de acetato (Spears, 1990), seja pela inibição de bactérias produtoras de formato e  $H_2$ , precursores do gás metano; apresentam mudanças nos produtos finais de fermentação e que resultam no aumento do conteúdo de energia líquida dos alimentos. A melhora na eficiência alimentar dos ruminantes pode ser resultado da economia dessa energia advinda da incorporação dos carbonos e hidrogênios ao propionato, que seriam lançados na atmosfera na forma de gás ( $CO_2$  e metano), principalmente via eructação (ruminação). Sabe-se, ainda, que o propionato é o principal substrato precursor de glicose pela gliconeogênese no fígado. Em níveis ou fases de produção em que a glicose advinda da digestão do amido no intestino delgado não é suficiente para atender às exigências de produção animal, a exemplo de vacas em período de transição (esses animais têm consumo reduzido nessa fase), maior produção de propionato ruminal pode, além de assegurar o suprimento de glicose, evitar que taxas elevadas de degradação de aminoácidos no rúmen ocorram para formação de glicose, em razão de estes serem os principais precursores de nova

glicose na falta de propionato. Evitar que aminoácidos sejam utilizados para esse fim equivale obter economia de energia e de proteína dietética. Conseqüentemente, haverá economia nos custos de produção, uma vez que o aumento de conteúdo protéico da dieta visando fornecer mais esqueletos de carbono para gliconeogênese é mais caro, além de aumentar o custo energético na excreção urinária de uréia.

Segundo Mirzoeva et al. (1997), a própolis e alguns de seus componentes possuem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora.

Uma vez constatada a eficiência da própolis em inibir a produção total de gases, buscou-se num segundo conjunto de experimentos estudar diferentes dosagens, em níveis econômicos, que resultariam na maior inibição da produção de gases, em analogia a outro ionóforo, a monensina, considerado eficiente nessa propriedade e de grande uso comercial. Pesquisas têm demonstrado que a monensina reduz a produção de metano (Lana & Russell, 1998) e, considerando que do total de gases produzidos na fermentação dos carboidratos pelos microrganismos ruminais, o metano corresponde a um terço do mesmo, evidencia-se a importância da monensina, e possivelmente da própolis, na melhoria da conversão alimentar de animais em produção.

Os valores médios para volumes finais de gases produzidos a partir de carboidratos fibrosos e não-fibrosos são mostrados nas Tabelas 2 e 3, respecti-

Tabela 1 - Produção de gases (volume final total-vf e volume final para carboidratos fibrosos-vfcf) e taxa de digestão específica de carboidratos fibrosos-Kcf e não-fibrosos-Kcnf

Table 1 - Gases production (total final gas volume-vf and final gas volume for fiber carbohydrates - vfcf) and specific digestion rate of fiber carbohydrates-Kcf and of non fiber carbohydrates - Kcnf)

Tratamento <i>Treatment</i>	Vf	Vfcf	Kcf	Kcnf
Extrato de própolis* <i>Propolis extract</i>	30,62b	19,67b	0,0235a	0,1692a
Solução alcóolica a 70% <i>Alcoholic solution at 70%</i>	33,75a	22,06a	0,0195b	0,1179b

\* Extrato de própolis = solução estoque (30 g de própolis bruta em 100 mL de solução alcóolica a 70% em água) diluída pela metade com a mesma solução.

Médias na mesma coluna, seguidas por letras distintas, diferem ( $P < 0,05$ ) pelo teste F.  
\* *Propolis extract - solution (30 g of crude propolis at 100 mL of alcoholic solution at 70% in water) diluted by half with the same solution.*

*Means, within a column, followed by different letters, differ ( $P < .05$ ) by F test.*

vamente. Para ambas variáveis foram observados efeitos significativos ( $P < 0,05$ ) com relação a tratamento, alimento, e interação entre estas fontes. Verifica-se, de maneira geral, que com o aumento da relação concentrado:volumoso, houve incremento na produção de gases provenientes dos carboidratos não-fibrosos, em detrimento aos

carboidratos fibrosos ( $P < 0,05$ ). Na Tabela 2, pode-se constatar que a própolis concentração de 66,7% foi mais eficiente em inibir a produção de gases dos carboidratos fibrosos, comparada aos outros tratamentos, inclusive monensina, quando incubada com a dieta 1 (100% do NDT advindo de alimento volumoso).

Tabela 2 - Produção de gases (volume final para carboidratos fibrosos) de três relações volumoso/concentrado tratados com monensina ou diferentes níveis de extratos de própolis

Table 2 - Gases production (final gas volume for fiber carbohydrates) of three roughage/concentrate ratios treated with monensin or different levels of propolis extract

Alimento <i>Feedstuff</i>	Tratamentos*				
	Controle <i>Control</i>	Pr(16,7%)	Pr(33,3%)	Pr(66,7%)	Monensina <i>Monensin</i>
Volumoso <i>Roughage</i>	31,05aA	28,47aA	31,82aA	14,04cA	24,41bA
Vol./conc. <i>Roughage/concentrate</i>	25,19aB	23,17aB	22,49aB	12,53bAB	14,29bB
Concentrado <i>Concentrate</i>	18,45aC	17,91aC	13,29bC	9,80bB	10,23bB

\* Controle = solução alcoólica a 70%, Pr (16,7; 33,3; e 66,7%) = Níveis de solução estoque de própolis (30 g de própolis bruta em 100 mL de solução alcoólica a 70% em água) adicionada à solução alcoólica para perfazer 100%.

Médias contendo letras desiguais, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

\* Control = alcoholic solution at 70%, Pr (16.7, 33.3, and 66.7%) = Levels of propolis solution (30 g of crude propolis at 100 mL of alcoholic solution at 70% in water) added to the alcoholic solution to reach 100%.

Means, followed by different letters, small within a row and capital within a column, differ ( $P < .05$ ) by SNK test.

Tabela 3 - Produção de gases (volume final para carboidratos não-fibrosos) pela incubação de 100 mg de alimentos em três relações volumoso/concentrado, tratados com diferentes níveis de extrato de própolis e monensina

Table 3 - Gas production (final gas volume for non fiber carbohydrates) from incubation of 100 mg of feedstuffs at three roughage/concentrate ratios treated with different levels of propolis extract and monensin

Alimento <i>Feedstuff</i>	Tratamentos*				
	Controle <i>Control</i>	Pr(16,7%)	Pr(33,3%)	Pr(66,7%)	Monensina <i>Monensin</i>
Volumoso <i>Roughage</i>	14,69 aA	14,54 aB	5,67 bC	7,29bB	4,68 bB
Vol./conc. <i>Roughage/concentrate</i>	15,98 aA	16,84 aAB	12,96 aB	9,49 bB	12,98 aA
Concentrado <i>Concentrate</i>	16,73 abA	18,48 aA	18,39 aA	14,84 bA	16,20bA

\* Controle = solução alcoólica a 70%, Pr (16,7; 33,3; e 66,7%) = Níveis de solução estoque de própolis (30 g de própolis bruta em 100 mL de solução alcoólica a 70% em água) adicionada à solução alcoólica para perfazer 100%.

Médias contendo letras desiguais, minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, diferem pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).

\* Control = alcoholic solution at 70%, Pr (16.7, 33.3, and 66.7%) = Levels of propolis solution (30 g of crude propolis at 100 mL of alcoholic solution at 70% in water) added to the alcoholic solution to reach 100%.

Means, followed by different letters, small within a row and capital within a column, differ ( $P < .05$ ) by SNK test.

Quando se incubaram os alimentos da dieta 2 (50% do NDT advindo de volumoso e 50% de concentrado), novamente a própolis em solução estoque 66,7% foi superior aos outros níveis de própolis em inibir a produção de gases, mas desta vez igualando-se à monensina. Na incubação da dieta 3 (100% do NDT advindo do alimento concentrado), a própolis em solução-estoque 33,3% foi suficiente para inibir a produção de gases em níveis de significância equiparados à monensina e à própolis a 66,7%.

Com relação à produção de gases a partir de carboidratos não fibrosos (Tabela 3), a solução-estoque a 33,7%, quando incubada com alimento volumoso, foi igualmente eficiente à solução a 66,7% e à monensina na redução da produção de gás. Quando o nível de carboidratos não-fibrosos da dieta se elevou (dietas 2 e 3), maiores concentrações de própolis foram necessárias para causar a inibição da produção de gases.

O menor nível de própolis (16,7%) não apresentou efeito sobre as dietas avaliadas, para o volume final de gases advindos de carboidratos fibrosos e não-fibrosos. Evidencia-se, que o maior nível de própolis (66,7%) se mostrou eficiente diante de todas as dietas, para ambos os carboidratos, suplantando, muitas vezes, a monensina quanto à menor produção final de gases.

Na Tabela 4, pode-se verificar o efeito de tratamento sobre o volume final total de gases. Os tratamentos com as maiores concentrações de própolis (33,3 e 66,7%), oriundos da diluição da solução-estoque de própolis (extração de 30 g de própolis em pedra triturada para cada 100 mL de álcool a 70%, durante dez dias), mostraram-se eficientes em inibir a produção final de gases, enquanto o menor nível (16,7%) não resultou significância em relação ao controle.

Embora não se tenha domínio sobre as concentrações molares dos princípios ativos (principalmente flavonóides e cetoses) da própolis em cada tratamento, ao passo que esse domínio ocorra com a monensina incubada (adicionada para atingir 5,0  $\mu$ M como concentração final nos tubos de incubação), fica, todavia, demonstrada a potencialidade da própolis em inibir a produção de gases *in vitro*. O nível superior de própolis (solução a 66,7%) mostrou-se eficiente nas três relações volumoso:concentrado e, portanto, torna-se um valor referencial para novos estudos, inclusive com a expectativa de possibilidade de domínio sobre as concentrações e tipos de princípios ativos da própolis utilizada.

Tabela 4 - Efeito de diferentes níveis de extrato de própolis e monensina sobre a produção total de gases após 72 horas de incubação de 100 mg de volumoso e concentrado em diferentes proporções

Table 4 - Gases total production after 72 hours of incubation of 100 mg of roughage and concentrate, at different proportions, with different levels of propolis extract and monensin

Tratamento <i>Treatment</i>	Volume final (Vf) <i>Final gas volume</i>
Controle <i>Control</i>	40,69A
Própolis 16,7% <i>Propolis 16.7%</i>	39,80A
Própolis 33,3% <i>Propolis 33.3%</i>	34,87B
Própolis 66,7% <i>Propolis 66.7%</i>	22,66D
Monensina <i>Monensin</i>	27,60C

Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste SNK ( $p < 0,05$ ).

Means followed by different letters differ ( $P < .05$ ) by SNK test.

## Conclusões

A própolis foi eficiente em inibir a produção de gases *in vitro* pelos microrganismos ruminais. Somando-se ao fato de que a mesma possibilitou aumento da taxa de digestão específica dos carboidratos, conclui-se que devem ser realizadas novas pesquisas que explorem a própolis como novo aditivo na nutrição de ruminantes.

## Literatura Citada

- ANUALPEC. 2001. Anuário da Pecuária Brasileira. Ed. Argos Comunicação. 359p.
- BANKOVA, V.; MARCUCCI, M.C.; SIMOVA, S. et al. Antibacterial diterpenic acids from brazilian propolis. *Zeitschrift fur Naturforschung*, v.51, n.5-6, p.277-280, 1996.
- CABRAL, L.S; VALADARES FILHO, S.C.; MALAFAIA, P.A.M. et al. Frações de carboidratos de alimentos volumosos e suas taxas de degradação estimadas pela técnica de produção de gases. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.29, n.6, p.2087-2098, 2000. (Suplemento 1)
- CRUTZEN, P.J.; ASELMANN, I; SEILER, W. Methane production by domestic animals, wild ruminants, other herbivorous fauna and humans. *Tellus*, v.38B, p.271-284. 1986.
- EUCLYDES, R.F. *Sistema de Análises Estatísticas e Genéticas – SAEG x Guia do usuário*. Central de Processamento de Dados, Viçosa, MG. 1993.

- GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.
- GOULART, C.S. **Estudos preliminares sobre atividade “in vitro” do extrato etanólico de própolis (EEP) no combate a bactérias isoladas de processos infecciosos de animais**. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1995. 18p. Monografia - Escola de Medicina Veterinária - Universidade Federal da Bahia, 1995.
- LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; Van AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2190-2196, 1998.
- LANGONI, H.; DOMINGUES, P.F.; FUNARI, S.R.C. et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* da propolis. In: CONGRESSO IBEROLATINOAMERICANO DE APICULTURA, 4., 1994, Rio Cuarto, Argentina. **Anais...** Rio Cuarto, Argentina: 1994. p.189-192.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms**. 8.ed. London: Prentice Hall, 1997, 566 p.
- MALAFAIA, P.A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; VIEIRA, R.A.M. et al. Cinética ruminal de alguns alimentos investigada por técnicas gravimétricas e metabólicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.27, n.2, p.370-380, 1998.
- MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.
- PARK, Y.K.; KOO, H.; IKEGAKI, M. et al. Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. **Revista de Microbiologia**, v.29, p.143-148, 1998.
- PARK, Y.K.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M. Classificação das própolis brasileira a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem Doce**, v.58, n.9, p.3-7, 2000.
- PINTO, M.S. **Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 92p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- RUSSEL, J.B.; STROBEL, H.J. Minireview: effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, p.1-6, 1989.
- SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, v.72, n.11, p.2980-2991, 1994.
- SPEARS, J.W. Ionophores and nutrient digestion and absorption in ruminants. **Journal of Nutrition**, v.120, p.632-638, 1990.
- VARGAS, A.C.; POCAI, E.A.; FONTANA, F.Z. et al. Dados parciais do teste “*in vitro*” da atividade antibacteriana da própolis. In: Congresso de Medicina Veterinária do Cone Sul, I & Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 12., 1994, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SOVERGS, 1994. 160p.

Recebido em: 18/02/03

Aceito em: 25/09/03