

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DA PRÓPOLIS
PRODUZIDA NO MUNICÍPIO DE TERENOS – MS:
MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E AMBIENTE
RUMINAL**

Maria de Fátima Falcão Gomes

CAMPO GRANDE - MS
2014

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *in vitro* DA PRÓPOLIS
PRODUZIDA NO MUNICÍPIO DE TERENOS – MS:
MICRORGANISMOS PATOGÊNICOS E AMBIENTE
RUMINAL**

In vitro antibacterial activity of propolis produced in Terenos city, MS:
pathogenic microorganisms and environment ruminal

Maria de Fátima Falcão Gomes

Orientadora: Dra. Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo

Co-orientadora: Dra. Cássia Rejane Brito Leal

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS, 2014

Certificado de aprovação

MARIA DE FÁTIMA FALCÃO GOMES

Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis produzida no município de Terenos – MS;
microorganismos patogênicos e ambiente ruminal.

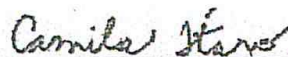
In vitro antibacterial activity of propolis produced in Terenos city, MS: pathogenic
microorganisms and ruminal environment.

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
doutora em Ciência Animal.


Área de concentração: Produção
Animal.

Aprovado(a) em: 28/11/2014

BANCA EXAMINADORA:



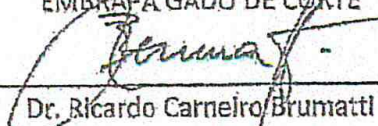
Dra. Camila Celeste Brandão Ferrelra Itavo
(UFMS – (Orientadora)



Dra. Luisa Melville Palva
UEMS



Dr. Rodrigo da Costa Gomes
EMBRAPA GADO DE CORTE



Dr. Ricardo Carneiro Brumatti
UFMS



Dr. Luis Carlos Vinhas Itavo
UFMS

Às minhas amadas filhas Larissa e Ludimila,
ao meu neto Matheus
e meu esposo Breno.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha família, pela compreensão de minha ausência durante este período.

À Professora Doutora Camila Celeste Brandão Ferreira Ítavo, pela orientação, estímulo, amizade e educação com que me tratou.

À Professora Doutora Cássia Rejane Brito Leal, pela co-orientação, ensinamentos, dedicação, amizade e pelo apoio nos momentos difíceis.

Ao professor Luís Carlos Vinhas Ítavo, pelas valiosas sugestões e auxílio nas análises estatísticas que enriqueceram este trabalho.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFMS), pela oportunidade de realização do curso.

Aos membros da banca examinadora pelo tempo dispensado na leitura deste trabalho, contribuindo com melhorias para a finalização do mesmo.

Aos professores do Curso de Doutorado em Ciência Animal (UFMS), pelos conhecimentos transmitidos.

À Ricardo de Oliveira dos Santos, secretário do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal (UFMS), pela solicitude.

Aos professores da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (UFMS), que me incentivaram durante a realização do curso e aos funcionários pelo convívio fraterno.

A técnica do Laboratório de Bacteriologia da FAMEZ (UFMS), Lúcia Restel, pela amizade, pelo constante apoio fornecendo dados significativos e pela cotidiana frase: Você está precisando de alguma coisa?

À Jonilson Araújo da Silva, pela amizade e colaboração na análise química do extrato etanólico da própolis.

À Natália da Silva Heimbach e Eduardo de Souza Leal, pelo auxílio na implantação e condução de parte dos ensaios experimentais que foram desenvolvidos na Universidade Católica Dom Bosco, a qual sou grata pela oportunidade concedida.

À Resenângela Nantes, pelo auxílio nas determinações das Concentrações Inibitórias Mínimas.

À Gabriela Puhl Rodrigues pela amizade, pelo constante incentivo e pela valiosa colaboração.

Aos meus pais (*in memoriam*) pelo esforço e incentivo para a minha formação acadêmica, e a você meu Deus, que sempre me iluminou.

À todos que, de algum modo, contribuíram para a realização deste trabalho.

**“O primeiro passo para conseguir algo é desejá-lo”
Madre Tereza de Calcutá**

Resumo

GOMES, M.F.F. Atividade antibacteriana “*in vitro*” da própolis produzida no município de Terenos – MS: microrganismos patogênicos e ambiente ruminal. 2014. 63f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Objetivou-se com esse estudo avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom, produzida em Terenos, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Esta própolis foi proveniente das plantas: *Luehea* sp., *Piptadenia falcata*, *Tabebuia* spp., *Tabebuia caraíba*, *Vernonia* spp. e *Cecropia pachystachya*. Dois experimentos foram conduzidos, um sobre microrganismos ruminais e outro sobre patógenos clínicos. O extrato alcoólico de própolis 35% (35 g de própolis bruta macerada e 65 mL de álcool de cereais) apresentou 29,90 mg/mL de cera, 151,28 mg/mL de resíduo seco, 27,65 mg/mL de fenóis totais e 13,95 mg/mL de flavonoides totais. No primeiro ensaio avaliou-se a atividade antibacteriana do extrato de própolis por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de sensibilidade por microdiluição. Foram utilizados 32 isolados de bactérias Gram-positivas: *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., e 32 isolados de bactérias Gram-negativas: *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. e *Serratia rubidaea*. Todas as amostras de bactérias foram obtidas de processos clínicos infecciosos de animais domésticos, mantidas congeladas a -20°C, com criopreservante glicerol v/v. O extrato de própolis apresentou atividade antimicrobiana com uma CIM variando de 2,25 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-positivas e de 4,5 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-negativas. Conclui-se que esta própolis tem ação bactericida, porém, o efeito depende da espécie do microrganismo e de sua procedência. No segundo ensaio, avaliou-se a inclusão do extrato de própolis em quatro diluições em água (0-50-70-100%) e doses (4; 8; 12; 16 e 20 mL/kg de MS de ração), por meio da produção cumulativa de gases *in vitro* ajustada nos modelos Logístico Bicompartimental e Exponencial. A ração foi composta por 40 g/kg de feno de capim-Tifton e 60 g/kg de concentrado. As amostras foram incubadas por 96 horas. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com quatro tratamentos e cinco doses, em triplicata. Houve interação significativa entre tratamento e dose para degradabilidade da MS, com o tratamento sem aditivo foi igual a 678,55 g/kg e o tratamento com Álcool-puro apresentou efeito exponencial negativo com 303,61 g/kg para a dose de 20 mL/kg MS. O Extrato 100% apresentou os maiores valores de degradabilidade, com máximo estimado em 18,93 mL/kg MS. O Extrato 70% apresentou mínima de 6,35 mL/kg MS e o Extrato-50% 7,65 mL/kg MS. Houve efeito de tratamento e de dose sobre a produção de gases. O Tratamento Álcool-puro apresentou potencial de redução de -0,32 mL de gás para cada mL de álcool adicionado. No Extrato 70% a máxima estimativa foi 11,43 mL e 12,60 mL respectivamente para os modelos Bicompartimental e Exponencial. No Extrato 100% as máximas foram 13,10 mL e 12,07 mL de extrato, respectivamente, com as maiores estimativas de produção de gases, com valores acima de 30 mL de gás/100mg de MS fermentada. O extrato alcoólico de própolis tem ação positiva sobre a degradabilidade e produção de gases. Sugere-se a utilização de 13 mL/kg MS do extrato alcoólico de própolis 35%, para rações com relação volumoso:concentrado igual a 40:60 para bovinos.

Palavras-chave: aditivo; bactericida; concentração inibitória mínima; produção de gases *in vitro*; ruminantes.

Abstract

GOMES, M.F.F. Antibacterial activity "*in vitro*" of propolis produced in the municipality of Terenos - MS: pathogenic and rumen microorganisms. 2014. 63f. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

This study had the objective of evaluate the *in vitro* antibacterial activity of brown propolis, that was produced in Terenos, Mato Grosso do Sul State, Brazil. This propolis was obtained from the following plants: *Luehea* sp., *Piptadenia falcata*, *Tabebuia* spp., *Tabebuia caraiba*, *Vernonia* spp. and *Cecropia pachystachya*. Two experiments were conducted about rumen microorganisms and clinic pathogens. The alcoholic extract of propolis 35% (35g of macerated raw propolis and 65 mL of alcohol) had 29.90 mg/mL of wax, 151.28 mg/mL of dry residue, 27.65 mg/mL of total phenols and 13.95 mg/ml of total flavonoids. In the first experiment, the antibacterial activity of propolis extract was evaluated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by the technique of sensitivity using microdilution. Thirty-two isolates of Gram-positive bacteria were used: *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. The thirty-two isolated Gram-negative bacteria were: *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp, *Salmonella* spp. and *Serratia rubidaea*. All bacterial samples were obtained from clinical infectious processes from domestic animals, that were frozen at -20 °C with glycerol criopreservante v/v. The propolis extract showed antibacterial activity with a MIC ranging from 2.25 to 18.9 mg/mL for the Gram-positive bacteria and from 4.5 to 18.9 mg/mL for the Gram-negative bacteria. It was concluded that propolis had antibacterial action, but the effect depends on the species of the bacteria and its origin. In the second experiment, it was evaluated the inclusion of propolis extract in four dilutions in water (0-50-70-100%) and doses (4, 8, 12, 16 and 20 mL/kg DM diet) through the cumulative gas production *in vitro* technique using adjusted Logistic Bicompartimental and Exponential models. The substrate was composed of 40 g/kg Tifton hay and 60 g/kg of concentrate. The samples were incubated for 96 hours. The statistical design was a completely randomized factorial design with four treatments and five doses in triplicate. There was a significant interaction between treatment and dose for DM degradability. Treatment without additive was 678.55 g/kg. Alcohol-pure treatment showed a negative exponential effect with 303.61 g/kg for the dose of 20 mL/kg DM. The Extract 100% showed the highest values of degradability, with maximum estimated at 18.93 mL/kg DM. The Extract 70% showed minimum 6.35 mL/kg DM and Extract 50% 7.65 mL/kg DM. There was effect of treatment and dose on the gas production. The Alcohol pure Treatment presented reduction potential of -0.32 mL gas for each ml of alcohol added. For the Extract 70% the maximum estimative was 11.43 mL and 12.60 mL for the models Bicompartimental an Exponential, respectively. For the Extract 100% on-peak was 13.10 mL and 12.07 mL for the Bicompartimental and Exponential models, respectively, with the highest estimative of gas production, with values above 30 mL gas/100 mg fermented DM. The alcoholic extract of propolis has a positive action on the degradability and gas production. It's possible to suggest using 13 ml of alcoholic extract of propolis 35%, for diets with proportion roughage:concentrate equal 40:60 for cattle.

Keywords: additive; bactericide; Minimum Inhibitory Concentration; *In vitro* gas production; ruminants.

Lista de tabelas

Artigo 1. Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom produzida no Município de Terenos – MS

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato alcoólico de própolis produzida em Terenos-MS, frente a bactérias Gram-positivas.....	39
Tabela 2 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato alcoólico de própolis produzida em Terenos – MS, frente a bactérias Gram-negativas.....	40

Artigo 2. Cinética da produção de gás e degradabilidade *in vitro* de rações contendo doses crescentes de extrato alcoólico de própolis marrom

Tabela 1 - Proporção de ingredientes e composição química da ração	59
Tabela 2 - Degradabilidade da matéria seca (g/kg MS) em função das diluições e das doses utilizadas em 96 horas de fermentação <i>in vitro</i>	60
Tabela 3 - Estimativas da produção cumulativa de gases (mL/100 mg MS) pelo Modelo Logístico-Bicompartimental, em função das diluições e das doses adicionadas (0, 4, 8, 12, 16 e 20 mL/kg MS) em 96 horas de fermentação <i>in vitro</i>	61
Tabela 4 - Estimativas da produção cumulativa de gases (mL/100 mg MS) pelo Modelo Exponencial, em função das diluições e das doses adicionadas (0, 4, 8, 12, 16 e 20 mL/kg MS) em 96 horas de fermentação <i>in vitro</i>	62

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1 Própolis	1
2 Composição química, origem botânica e processamento da própolis	2
3 Atividade antimicrobiana.....	8
4 Própolis na saúde animal e na produção de ruminantes	11
REFERÊNCIAS	18
Artigo 1. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DA PRÓPOLIS MARROM PRODUZIDA NO MUNICÍPIO DE TRENOS – MS	26
Resumo	26
Abstract.....	27
Introdução	27
Material e Métodos	29
2.1 Extrato de Própolis	29
2.2 Amostras de bactérias.....	29
2.3 Atividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis	30
Resultados e Discussão	30
Conclusão.....	34
Referências.....	35
Artigo 2. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DE GÁS E DEGRADABILIDADE <i>IN VITRO</i> DE RAÇÕES CONTENDO DOSES CRESCENTES DE EXTRATO ALCOÓLICO DE PRÓPOLIS MARROM	41
Resumo	41
Abstract.....	42
Introdução	43
Material e Métodos	44
Resultados e Discussão	47
Conclusão.....	53
Referências.....	53
CONSIDERAÇÕES FINAIS	63

INTRODUÇÃO

1 Própolis

Própolis, ou cola de abelha, é uma mistura de substâncias resinosas que as abelhas coletam de várias partes das plantas, adicionam enzimas salivares, maceram e depositam em suas colmeias (MARCUCCI, 1995). A própolis tem a função de proteger o enxame, fechando pequenos orifícios da caixa, mumificando insetos que morrem no interior da colmeia, defendendo contra a invasão de microrganismos, protegendo a entrada da colmeia e fortalecendo os favos (MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al., 2000). Durante o período em que ocorre baixa disponibilidade de resinas ou estas se tornam difíceis para serem coletadas, como na vegetação de pinhais, as abelhas incorporam maior quantidade de cera na própolis (BURDOCK, 1998).

A coloração da própolis depende de sua procedência, variando do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até um marrom avermelhado e apresenta odor característico que pode variar de uma amostra para outra (MARCUCCI, 1996). Dausch et al. (2008) analisaram a própolis de cor vermelha, caracterizando-a como proveniente de plantas situadas em manguezais do nordeste brasileiro.

Em toda extensão do território brasileiro são encontradas plantas apícolas, as quais irão diferenciar a própolis produzida pelas abelhas. A grande diversidade das plantas apícolas, a época de coleta da resina, a genética das abelhas e a região geográfica proporcionam à própolis uma variedade de compostos químicos proporcionando diferentes atividades terapêuticas (MARCUCCI, 1995; MARCUCCI, 1996; PARK et al., 1998; FUNARI; FERRO, 2006; CASTRO et al., 2007).

A espécie vegetal utilizada pelas abelhas para coleta de resina é indicador para verificação da composição química da própolis. A comparação entre a composição da própolis e os extratos florais da vegetação situada nas proximidades do apiário também é usada para identificar a origem deste produto (BANKOVA et al., 2000).

A origem botânica da própolis vem sendo estudada levando-se em consideração a análise do pólen na resina e da provável fonte da espécie vegetal. Diversos trabalhos foram desenvolvidos para se obter dados das diferentes propriedades das própolis produzidas no Brasil, tendo como suporte o extrato de partes da planta e a resina da própolis (BARTH et al., 1999; FREITAS et al., 2010; FREITAS et al., 2011; SILVA et al., 2012).

De acordo com a legislação brasileira vigente, própolis é o “produto oriundo de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas de brotos, flores e

exsudatos de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para elaboração final do produto”. No Brasil, os produtos apícolas possuem regulamento técnico de identidade e qualidade, no qual os requisitos físico-químicos da própolis bruta são: umidade máxima de 8%, cinza máxima de 5%, cera máxima de 25%, massa mecânica máxima de 40%, compostos fenólicos mínimo de 5% (m/m), solúveis em etanol mínimo de 35% (m/m), flavonoides mínimo de 0,5% (m/m) e índice de oxidação máximo de 22 segundos (BRASIL, 2001).

O conhecimento da composição química, das atividades biológicas e da fonte vegetal que produz a própolis é de fundamental importância para padronização e agregação de valor ao produto (LUSTOSA et al., 2008).

2 Composição química, origem botânica e processamento da própolis

A própolis é uma substância proveniente da resina vegetal. Apresenta, em média, 50% de resinas e substâncias balsâmicas, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de grãos de pólen e 5% de outras substâncias, tais como, ácidos orgânicos, minerais incluindo cálcio, estrôncio, ferro, alumínio, cobre e manganês e vitaminas - B1, B2, B6, C e E (BANKOVA et al., 1992; MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al., 2000; PARK et al., 2002b; BANKOVA et al., 2002; CASTRO et al., 2007).

É uma substância resinosa que as abelhas produzem a partir da coleta de diversas partes das plantas, como brotos, botões florais, cascas e exsudatos resinosos. Durante o processo de produção as abelhas misturam a resina de própolis com a cera e com a enzima β -glicosidase da saliva, acarretando a hidrólise dos flavonoides glicosidados, formando flavonoides agliconas. Os flavonoides são compostos polifenólicos naturais encontrados nos vegetais superiores (PARK et al., 1998; PEREIRA et al., 2002; PACKER; LUZ, 2007).

Os parâmetros físico-químicos adotados pela legislação brasileira para o controle de qualidade da solução alcoólica de própolis são: extrato seco - mínimo 11% (m/v), cera - máximo 1% do extrato seco (m/m), compostos flavonoides - mínimo 0,25% (m/m), compostos fenólicos - mínimo 0,50%, atividade de oxidação - máximo 22 segundos, teor alcoólico - máximo 70 °GL (v/v), metanol - máximo 0,40 mg/L, espectro de absorção de radiação UV/VIS picos característicos entre 200 e 400 nm, acetato de chumbo positivo e hidróxido de sódio positivo (BRASIL, 2001).

A estabilidade da enzima salivar β -glicosidase presente na própolis chinesa foi estudada por Zhang et al. (2011), verificando que a mesma diminui com o tempo de

armazenamento quando acondicionada à temperatura ambiente, no entanto, conserva-se quando congelada. Deste modo, os componentes químicos da própolis podem ser estudados, baseando-se no fato de que a atividade da β -glicosidase é um indicativo de própolis recém-elaborada pelas abelhas.

As pesquisas têm demonstrado que as condições climáticas e a flora apícola visitada pelas abelhas influenciam na composição química da própolis. Korn et al. (2013) analisaram amostras de própolis verde, marrom e vermelha provenientes de seis regiões do estado da Bahia, encontraram semelhanças e diferenças entre as própolis dos diferentes apiários.

A composição química da própolis inclui flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), que são compostos polifenólicos naturais largamente distribuídos nos vegetais superiores. Também apresenta ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em pequenas quantidades (MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al., 2000; PACKER; LUZ, 2007; LUSTOSA et al., 2008).

É preciso estabelecer um padrão para garantir a qualidade, eficácia, e segurança da própolis, entretanto a padronização torna-se difícil devido aos vários fatores que influenciam a composição química e atividade biológica, o que suscitou a realização de diversos trabalhos no Brasil com o objetivo de verificar a composição química e ação biológica da própolis (LUSTOSA et al., 2008).

Análises físico-químicas de amostras de própolis provenientes do Brasil, Uruguai e China foram realizadas por Serra Bonvehi et al. (1994), verificando variação na composição e atividade bacteriostática da própolis proveniente de diferentes origens botânica e geográfica, sendo que a ação antibacteriana da própolis está relacionada ao efeito sinérgico de todos flavonoides e outros compostos fenólicos, pois os autores não encontraram correlação entre componente individual e ação antibacteriana.

No sul do Brasil, Argentina e Uruguai, Park et al. (2002a) classificaram a própolis em 5 grupos, evidenciando a grande diversificação da própolis advinda de tal região. Também, pesquisando a origem e a composição química da própolis brasileira, Park et al. (2002b) classificaram a própolis em doze grupos, de acordo com as características físico-químicas, sendo cinco grupos no sul, um no sudeste e seis no nordeste. A própolis do grupo três foi identificada como sendo uma resina do botão floral de *Populus*, a própolis do grupo seis

proveniente da resina de folhas jovens de *Hyptis divaricata* e a própolis do grupo doze proveniente da *Baccharis dracunculifolia*.

A região geográfica onde a própolis foi coletada, bem como o processo de extração exercem influência direta sobre a qualidade da mesma. Cunha et al. (2004), estudando a influência do processo de extração de própolis oriundas do sudeste do Brasil sobre o rendimento e teor de fenóis totais, verificaram maiores rendimentos com o uso de 70% de etanol ou um volume maior deste solvente, sem diferença entre extratos de macerações com ou sem luz. Somado a isso, houve aumento no rendimento por maceração durante 10 e 30 dias, sem variação significativa no teor de fenóis.

A própolis produzida no Quênia foi estudada por Muli; Maingi (2007) com o objetivo de avaliar a susceptibilidade das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi* ATCC 2202, *Escherichia coli* Standard Cultura 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 20591 e *Bacillus subtilis* ATCC 6633, aos extratos etanólicos de própolis produzidos com 30g de cada amostra de própolis a qual foram adicionados 100 mL dos solventes: etanol absoluto puro, etanol e água destilada (70%, 50% e 30% de etanol v/v), sendo utilizado o método de difusão em disco. O extrato 70% apresentou o melhor efeito antibacteriano, sendo as duas bactérias Gram-positivas mais sensíveis que *P. aeruginosa* e *E. coli*, no entanto, ocorreu semelhança de sensibilidade entre *S. typhi* e bactérias Gram-positivas. Há de se destacar que alguns desses microrganismos estão presentes no rúmen e/ou são causadores de infecções tais como mastite.

A preparação do extrato etanólico e aquoso foi desenvolvida por Park et al. (1998), verificando que a maioria dos flavonoides foi extraída nas concentrações alcoólicas entre 60 e 80%, onde foram extraídos compostos fenólicos que apresentaram uma inibição satisfatória do crescimento microbiano, no entanto os extratos etanólicos a 70 e 80% apresentaram grande atividade antioxidante.

Gonsales et al. (2006), investigando a atividade antibacteriana do extrato etanólico de própolis 30%, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 35218, em associação com a determinação do teor de flavonoides de própolis dos estados de Goiás, Paraná e São Paulo, verificaram uma correlação positiva entre a atividade antibacteriana e a quantidade de flavonoides, contra *Staphylococcus aureus*, mas não contra *Escherichia coli*, demonstrando efetiva ação contra bactéria Gram-positiva, independente da origem geográfica.

Orsi et al. (2005) avaliando a ação do extrato de própolis proveniente do Brasil e da Bulgária, sobre a atividade dos macrófagos, os quais desempenham papel importante no início

da infecção por *Salmonella typhimurium*, verificaram aumento da atividade bactericida dos macrófagos.

A própolis apresenta compostos fenólicos especialmente flavonoides, predominantes na própolis europeia, e ácidos fenólicos, predominantes na própolis brasileira. Embora, a concentração de flavonoides da própolis brasileira seja relativamente pequena, é possível quantificá-los e utilizar os valores obtidos como parâmetro para o controle de qualidade química (MARCUCCI et al., 1998; BANKOVA, 2005b; DAUGSCH et al., 2008; BARTH et al., 2013).

A combinação de todos estes fatores afetam as propriedades farmacológicas da própolis, a qual tem sido classificada em diferentes tipos como marrom, verde e vermelha. De acordo com Silva et al. (2008) a própolis vermelha é o novo tipo de própolis brasileira que apresenta altas porcentagens de isoflavonoides 3-hidroxi-8, 9 dimethoxypterocarpan e medicarpina.

A própolis verde é oriunda principalmente dos ápices vegetativos das plantas de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*). No entanto, pode ocorrer uma variação na composição química, sugerindo que outras fontes vegetais forneçam resinas alternativas. Os componentes predominantes da resina de própolis verde são os ácidos cinâmicos, seus ésteres e os dipertenos (SALATINO et al., 2005). O Artepellin C, também presente na própolis verde, possui propriedades anti-inflamatórias, antibacteriana, antitumoral e antioxidativa (PAULINO et al., 2003).

Popova et al. (2013), pesquisaram a origem botânica, a composição química e a atividade antibacteriana da própolis proveniente da região de Omani situada na Península Árabe, verificaram que a planta *Azadirachta indica* é fornecedora da resina de própolis que apresenta em sua composição quantidade significativa de flavononas C5-prenilo, diferenciando-o dos demais tipos de própolis conhecidos. Foram também, identificadas *Acacia* spp como fornecedoras de uma importante fonte de resina de própolis, com potencial ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Entre os componentes da própolis, os derivados cinâmicos (ácido cafeico fenil éster - CAPE e ácido cafeico) e flavonoides (quercetina e naringenina) afetam o potencial da membrana bacteriana e motilidade, sugerindo que estes compostos atuem como antimicrobianos. Assim, é possível que os efeitos bactericida e bacteriostático da própolis sejam resultantes de várias ações combinadas destes componentes (MIRZOEVA et al., 1997).

Na composição química da própolis são encontrados o ácido cafeico, ácido p-cumárico, 3 – prenil – 4 hidroxicinâmico, 3,5 – diprenil – 4 hidroxicinâmico, 1 – campferol (flavonoide) (BANKOVA et al., 2000).

Park et al. (2002b) verificaram a origem e a composição química da própolis brasileira, classificando-a em doze grupos: cinco grupos na região sul, um na região sudeste e seis na região nordeste. A própolis do grupo três (sul) foi identificada como sendo uma resina do botão floral de *Populus*, a própolis do grupo seis (nordeste) proveniente da resina de folhas jovens de *Hyptis divaricata* e a própolis denominada grupo doze (sudeste) proveniente da *Baccharis dracunculifolia*.

Com o objetivo de estabelecer um controle de qualidade da própolis, bem como verificar sua origem botânica, Funari; Ferro (2006) coletaram amostras de própolis produzida em uma área de proteção ambiental (Serra do Japi, no município de Cabreúva – SP), com predominância de planta *Baccharis dracunculifolia*. Identificaram os ácidos clorogênico, cafeico, para-cumárico, ferúlico, trans-cinâmico, flavonoides e Artepelin C (ácido 3,5 – diprenil – 4 – hidroxicinâmico), sendo esse último um marcador fitoquímico em potencial desta planta. Assim, concluíram que a comparação cromatográfica entre a própolis e sua suposta fonte botânica poderia ser incorporada no controle de qualidade do extrato.

A própolis obtida a partir de *Baccharis* (Asteraceae) ocorre principalmente em regiões montanhosas do sul do Estado de Minas Gerais até a parte norte do Estado do Paraná, apresentando um alto teor de Artepillin-C (BARTH et al., 2013), em áreas de crescimento de *Baccharis* e com a presença de outras espécies de plantas da família das Asteraceae, como *Eupatorium*, que devem contribuir para a produção de própolis com alto teor de flavonoides.

Donnelly et al. (1973) realizaram análises fitoquímicas da planta *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub., conhecida como rabo de bugio, identificando a presença de grande quantidade de isoflavonoides. Com o objetivo de analisar comparativamente as amostras de exsudato resinoso desta planta, bem como da própolis vermelha coletada de colmeias localizadas nos manguezais do litoral do nordeste brasileiro, Dausch et al. (2008) utilizaram os métodos de Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência em Fase Reversa (CCDAE – FR) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa (CLAE – FR), e verificaram que a própolis vermelha é originada da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub., sendo essa classificada como própolis do grupo 13, com atividade antimicrobiana maior que a própolis produzidas em áreas com outras plantas.

Outro tipo de própolis vermelha produzida no litoral nordestino do Brasil, foi pesquisada por Luz et al. (2009), encontrando no sedimento da própolis pólen da planta *Schimus terebinthifolius* (“Aroeira vermelha”) e ausência de grãos de pólen de *Dalbergia ecastophyllum*, concluindo que outra fonte botânica também origina a própolis vermelha.

A composição química da própolis de uma região é influenciada pelos efeitos da sazonalidade, plantas apícolas fornecedoras da própolis e da região onde os enxames estão localizados (BANKOVA, 2005b; CASTRO et al., 2007; MORAES, 2009; SOUZA et al., 2010).

Considerando o aumento da procura pela própolis como fitoterápico e aditivo para animais, a sua produção em escala comercial é de fundamental importância. Diante dessa necessidade, Martinez; Soares (2012) sugeriram que o melhoramento genético das abelhas fosse estudado com o objetivo de aumentar a produção de própolis em quantidade e qualidade.

O levantamento da flora apícola de uma região é imprescindível para o desenvolvimento da atividade apícola. Diante disto, diversos trabalhos foram desenvolvidos no atual Setor de Apicultura da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), entre estes, o realizado por Faustino; Gomes (1996) no município de Terenos no estado de Mato Grosso do Sul, que constataram picos de floradas entre os meses de maio a outubro, fornecendo néctar, pólen e própolis. Nos demais meses foi observado florada fornecendo néctar e/ou pólen que serviam de subsistência para as colmeias.

O primeiro passo para o processamento é a remoção da cera e impurezas, em seguida, a maceração da própolis em solventes e posterior análise dos mesmos (BURDOCK et al., 1998). Considerando que no processamento da própolis a cera deve ser removida, Hogendoorn et al. (2013) desenvolveram um método alternativo para remoção e quantificação do conteúdo de cera da própolis, baseado na diferença entre densidade específica, com adição de água e aquecimento por micro-ondas. Após chegar à temperatura ambiente, um sistema de três fases promove a separação completa, com a própolis na camada superior, e as amostras com variação entre 10 e 42,5% de cera de abelha, com médias de 11,1% (HOGENDOORN et al., 2013), entretanto, é necessária a avaliação da ação do extrato obtido.

Após o processamento, a própolis deve ser armazenada entre 0 – 4°C, ou a temperatura ambiente. Durante três ou quatro anos não ocorre redução da sua atividade biológica, porém, o aquecimento a 60°C destrói parcialmente a sua ação antibacteriana (BANKOVA, 2005a).

É preciso estabelecer um padrão químico para garantir a qualidade, eficácia, e segurança da própolis. A padronização torna-se difícil devido aos vários fatores que influenciam na composição química e sua atuação como atividade biológica. Em vários estados do Brasil foram desenvolvidos diversos trabalhos com o objetivo de verificar a composição química e ação biológica da própolis (LUSTOSA et al., 2008).

O extrato de própolis contendo álcool confere um sabor não agradável. Desta forma, pesquisas são realizadas para extrair a própolis com outras substâncias. Com o objetivo de avaliar a composição química e a atividade biológica de extrato oleoso de própolis, proveniente do município de Prudentópolis – PR, como uma alternativa ao extrato etanólico, Buriol et al. (2009) empregaram as técnicas de espectrometria de massa com ionização por *electrospray* (ESI – MS) e espectrofotometria no UV, concluindo que é viável a extração da própolis com óleo vegetal, obtendo substâncias fenólicas bioativas em tempos menores.

3 Atividade antimicrobiana

A própolis possui como característica essencial, a ação contra microrganismos e tem sido utilizada desde os tempos antigos devido às suas propriedades farmacêuticas. A própolis apresenta propriedades biológicas antibacterianas, antifúngicas e antivirais, além de possuir outras atividades: anti-inflamatória, antiúlcera, anestésico local, hepatoprotetora, antitumoral e imune estimulante (MARCUCCI, 1995; BURDOCK, 1998; PARK et al., 1998; BANKOVA et al., 2000; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A própolis e alguns de seus constituintes (ácido cafeico fenil éster - CAPE e quercetina) causam significativa inibição da motilidade bacteriana, sugerindo que a própolis contém componentes que atuam como ionóforos (MIRZOEVA et al., 1997).

Os flavonoides possuem compostos que atuam como antimicrobianos, inibindo a função da membrana citoplasmática, metabolismo energético e a síntese de ácido nucleico (CUSHNIE; LAMB, 2005). O potencial antimicrobiano dos flavonoides depende do número e da posição do grupo hidroxila e da presença dos grupos alifáticos e glicosil em sua estrutura (ALCARAZ et al., 2000).

As propriedades químicas da própolis apresentam importante valor farmacológico como um complexo natural e não como uma fonte de compostos que atuam isoladamente (KUJUMGIEV et al., 1999).

De acordo com Winn Jr. et al. (2008), a coloração de Gram ajuda a diferenciar as bactérias com base na sua parede celular em Gram-positivas e Gram-negativas. A parede

celular de bactérias Gram-negativas é mais fina que a de bactérias Gram-positivas, porém, é mais complexa. A membrana externa das bactérias Gram-negativas possui quantidade significativa de proteínas (proteína porina, transmembrana e proteína periférica).

As porinas são proteínas encontradas nas bactérias Gram-negativas formando canais transmembrana na membrana externa, através dos quais materiais de peso molecular mais baixo (aminoácidos, açúcares e íons) podem passar para o espaço periplásmico e muitas dessas porinas têm uma estrutura “trimérica” que formam um poro. As porinas também ajudam a limitar a passagem de muitos fármacos antimicrobianos para o interior da célula (WINN JR. et al., 2008).

A ação antimicrobiana da própolis sobre o crescimento, potencial de membrana e a motilidade das bactérias foi estudado por Mirzoeva et al. (1997). Neste trabalho foi identificado um efeito da própolis sobre a permeabilidade iônica da membrana interna da bactéria e mostrou que a própolis causou a dissipação do potencial da membrana, prejudicando a síntese de ATP, o transporte de íons e a motilidade da bactéria.

A própolis possui uma atividade antibacteriana maior contra as bactérias Gram-positivas e limitada contra Gram-negativas (MARCUCCI, 1996). As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular menos rígida do que as bactérias Gram-positivas, no entanto, quimicamente mais complexa, apresentando lipopolissacarídeo e somando-se a isto possui um teor lipídico maior, o que pode explicar essa maior resistência ao extrato de própolis (VARGAS et al., 2004). Os mesmo pesquisadores, analisando a atividade antibacteriana do extrato de própolis 50%, verificaram que 100% dos isolados de *Nocardia asteroides* foram sensíveis ao extrato, seguido por *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp. e *Rhodococcus equi*. Enquanto as Gram-negativas demonstraram resistência mais elevada que as bactérias Gram-positivas, sendo o maior percentual de sensibilidade o de *Pseudomonas aeruginosa*, seguido de *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* e *Salmonella* sp.

Compostos fenólicos da própolis brasileira com propriedades farmacológicas foram estudados por Marcucci et al. (2001), verificando que a atividade antibacteriana pode ser potencializada pelo aumento de grupos prenil ligados às moléculas de flavonoides.

Entre os fatores que influenciam na composição química da própolis, estão as diferentes raças das abelhas. Silici; Kutluca (2005) coletaram três amostras de própolis de três diferentes raças de abelhas, *Apis mellifera caucasica*, *Apis mellifera anatolica* e *Apis mellifera carnica*, mantidas no mesmo apiário, para verificar a atividade antimicrobiana do extrato de própolis a 30%, constatando que a própolis produzida por *Apis mellifera caucasica*

apresentou maior atividade antibacteriana por possuir uma maior concentração de compostos que inibem os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, quando comparadas com a própolis produzida pela *Apis mellifera anatolica* e *Apis mellifera carnica*.

Cabral (2008) isolou compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira, por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e de Ressonância Magnética Nuclear (RNM) e identificou um composto da classe das isoflavonas e um segundo composto, uma chalcona, que apresentaram alta atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*.

Park et al. (2002b) classificaram a própolis brasileira em 12 grupos de acordo com a composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante, sendo que as própolis do tipo 3 (Rio Grande do Sul), 6 (Bahia) e 12 (Minas Gerais) apresentaram as maiores atividades biológicas. A própolis tipo 12, conhecida como própolis verde, possui flavonoides e derivados de ácido cinâmico (Park et al., 2002a), já a própolis do tipo 6 tem um distinto padrão com baixo teor de flavonoides e maiores quantidades de compostos apolares.

A correlação entre a composição fenólica e as atividades biológicas apresentadas pela própolis do tipo 6 do Estado da Bahia e a própolis verde do tipo 12 de Minas Gerais, foram estudadas por Cabral et al. (2012), utilizando extrato etanólico de própolis (2 g de própolis e 15 mL de etanol 80%), e retirando uma alíquota de 25 mL do extrato etanólico de própolis diluída em 30 mL de etanol a 90% (v/v). Cabral et al. (2012) verificaram que o extrato etanólico de própolis do tipo 12 apresentou maior atividade antioxidante, enquanto a própolis tipo 6 apresentou maior atividade antimicrobiana e citotóxica e menor teor de flavonoides, concluindo que os compostos fenólicos não são os únicos responsáveis pela atividade biológica da própolis.

De acordo com Aguiar et al. (2013), os principais compostos fenólicos LLOS C3 encontrados nos extratos de própolis foram naringenina, crisina, ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido Artepelin C, sendo a naringenina um componente que apresentou efeito inibidor da atividade bacteriana ruminal.

A atividade antibacteriana da própolis proveniente da vegetação de uma área de transição entre o Cerrado e a Floresta Amazônica, no Estado de Tocantins, foi avaliada por Portilho et al. (2013), utilizando extrato etanólico 83,8% na proporção 1:3 (p/v), constatando halos de inibição para as bactérias Gram-negativas *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e *Escherichia coli* ATCC 25922 e para as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, sendo a melhor atividade antibacteriana sobre esta última.

Os aspectos ambientais, químicos e biológicos de amostras de própolis vermelha do litoral norte de Sergipe, bem como a sua variabilidade ao longo do ano foram estudados por Mendonça (2011), constatando que todos os extratos de própolis inibiram o desenvolvimento *in vitro* de *Candida* sp., sendo encontrada a formonometina como composto predominante.

Diversos processos metabólicos do organismo humano produzem substâncias oxidadas denominadas radicais livres que provocam uma série de efeitos deletérios à saúde humana. Foi demonstrado que a própolis contém flavonoides e compostos fenólicos que possuem capacidade de remover o excesso de radicais livres (CABRAL et al., 2009). Esta ação antioxidante se deve ao fato de que os flavonoides minimizam a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres (MARCUCCI et al., 1998).

Em estudos realizados sobre a atividade antioxidante da própolis produzida na ilha de Okinawa, no Japão, Kumazawa et al. (2007) verificaram que a posição de grupos geranil ou grupos prenil em flavonoides apresentaram um papel importante na atividade antioxidante desses compostos.

Os compostos fenólicos predominantes encontrados na própolis tailandesa foram a rutina, quercetina e naringenina. O extrato etanólico de própolis em diferentes soluções aquosas, 30%, 40%, 50% e 70%, exibiu atividade antioxidante, e antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella enteritidis*. A própolis tailandesa mostrou um elevado potencial para ser usada como um antioxidante e um agente antimicrobiano para aplicações alimentares (SIRIPATRAWAN et al., 2013).

Com o objetivo de investigar as origens botânicas de amostras de própolis brasileiras e suas composições químicas, Park et al. (2002b) estudaram amostras de própolis provenientes do Sul, Nordeste e Sudeste do Brasil, encontrando uma atividade antioxidativa em função do ácido cinâmico, ácido ferúlico e Artepelin C.

4 Própolis na saúde animal e na produção de ruminantes

Várias pesquisas vêm sendo realizadas buscando alternativas de produtos antimicrobianos naturais provenientes de plantas. Entre estes, o extrato de própolis tem demonstrado resultados satisfatórios.

Como demonstrado em diversas pesquisas, a vegetação de uma região encontra-se entre os fatores que influenciam na composição química da própolis e consequente atividade

antimicrobiana. Borges et al. (2014) avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos da própolis vermelha proveniente da Mata Atlântica de Alagoas e da própolis do tipo 6 da Bahia, frente a sensibilidade de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* sp. isolados de bovinos com mastite subclínica. Para obtenção dos extratos utilizaram 2 g de própolis em 15 mL de etanol 70% e aos resíduos obtidos foram adicionados 10 mL de etanol. Ocorreram diferenças nas atividades inibitórias dos extratos contra os microrganismos testados, sendo o maior potencial encontrado pela própolis G6 para *Staphylococcus* sp. com halo de inibição de 12 mm contra um halo de 16 mm apresentado pela gentamicina.

Com o objetivo de verificar o efeito do extrato etanólico de própolis vermelha brasileira (10 g de própolis adicionada em 100 mL de etanol 70%) sobre a saúde de ovelhas utilizando 3 g desse extrato/ovelha/dia, Morsy et al. (2013) avaliaram alguns parâmetros hematológicos e respostas parasitárias de ovelhas Santa Inês durante e após o período de *flushing*. O extrato etanólico de própolis aumentou o total de leucócitos, mas não houve diferenças significativas para outros parâmetros hematológicos. O extrato etanólico de própolis também diminuiu a quantidade de ovos dos parasitas nas fezes. Assim, a própolis pode ser um aditivo promissor durante períodos críticos, tais como o *flushing*.

Com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis (EEP) em rações isoprotéicas sobre o desempenho produtivo e prevenção de diarreia, Dierckx; Funari (1999) utilizaram 60 leitões Large White de ambos os sexos recém-desmamados submetidos aos tratamentos contendo T1:500 (0,5% de própolis), T2:1.500 (0,15% própolis), T3:4.500 mg/kg de EEP (0,45% própolis); T4: sem EEP, sem promotor de crescimento e nem coccidiostático (controle negativo) e T5: com 500 mg/kg de sulfato de cobre e 120 mg/kg de oxitetraciclina (controle positivo). Não houve efeito significativo entre os extratos de própolis e os tratamentos controle negativo e positivo, sobre as variáveis ganho de peso, consumo de ração e conversão alimentar.

A própolis tem sido utilizada em experimentos visando melhoria na saúde e produção animal, bem como alternativa para diminuir a poluição ambiental. Diversos trabalhos foram conduzidos com o objetivo de utilizar a própolis como aditivo ionóforo, substituindo a monensina que é fornecida aos ruminantes visando melhoria de desempenho animal.

A inclusão de ionóforos como aditivo em dietas para bovinos tem sido uma prática comum na manipulação da fermentação ruminal, aumentando a eficiência alimentar e produtividade (RUSSEL; STROBEL, 1989). Apesar dos efeitos positivos da monensina sódica no desempenho animal, este aditivo representa risco para a saúde humana, devido a

possíveis intoxicações e resistência das bactérias. Por essa razão, o ionóforo monensina foi proibido na Europa desde janeiro de 2006, através da Resolução da UE 1831/2003 (RÍSPOLI et al., 2009).

A própolis tem sido utilizada como aditivo na nutrição de ruminantes, apresentando uma ação ionófora, inibindo a produção de gases, principalmente do metano, na fermentação ruminal (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004a). A própolis e alguns de seus componentes (ácido cafeico fenil éster - CAPE e quercetina) provavelmente possuem efeito sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora, ocorrendo também uma significativa inibição da motilidade bacteriana (MIRZOEVA et al., 1997).

Oliveira et al. (2004) estudaram o efeito da monensina e do extrato de própolis obtido com 30 g de própolis moída em 100 mL de solução alcoólica (70% de álcool e 30% de água), sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio, utilizando líquido ruminal de bovino fistulado mantido em pastagem de *Brachiaria* spp., e verificaram que a monensina e a própolis foram eficientes em reduzir a produção de amônia de fontes de proteína de maior degradabilidade, sendo a própolis mais eficiente que a monensina, isto porque reduz a atividade da desaminação, com ação bacteriostática.

Dando continuidade a essa linha de pesquisa, Oliveira et al. (2006) conduziram um experimento com o objetivo de estudar os efeitos *in vitro* da monensina e do extrato de própolis obtido com 30 g de própolis moída em 100 mL de solução alcoólica (70% de álcool e 30% de água), sobre a fermentação ruminal de aminoácidos e verificaram que a própolis foi mais eficiente que a monensina em reduzir a produção de amônia de culturas de microrganismos ruminais em meio contendo caseína hidrolisada. A produção de amônia normalizou assim que a monensina foi removida do meio de cultura, provavelmente em razão do restabelecimento da população de bactérias produtoras de amônia, comprovando que esse antibiótico apenas inibe estes microrganismos.

Devido à ausência de estudos que demonstrassem os efeitos do extrato da própolis (30% de própolis em solução alcoólica a 70% em água) sobre a qualidade da carne bovina, Zawadzki et al. (2011) pesquisaram os efeitos da monensina sódica ou extrato alcoólico de própolis sobre as características da raça Nelore em confinamento. Os extratos de própolis foram preparados com álcool e as amostras foram diluídas em álcool 96 °GL com uma concentração fixa de extrato de própolis. Os pesquisadores verificaram que a adição do

extrato de própolis aumentou o ganho de peso e melhorou a conversão alimentar, em comparação com a monensina sódica, sem alteração nas características de carcaça, sugerindo o uso de própolis como aditivo por se tratar de um produto natural.

Em pesquisa realizada para investigar os efeitos da adição do óleo de soja (0 ou 120 g) e extrato de própolis (0 ou 10 mL de extrato etanólico de própolis/animal/dia) na alimentação de cabras leiteiras, Lana et al. (2005) verificaram que o extrato de própolis não interferiu no consumo, na digestibilidade, na produção e na composição do leite e nos parâmetros de fermentação ruminal.

Os efeitos dos aditivos própolis verde, própolis marrom e monensina sódica sobre o comportamento ingestivo e produtividade de cordeiros confinados foram estudados por Ítavo et al. (2011), concluindo que a própolis marrom pode ser um aditivo para substituir a monensina sódica em dietas para ovinos confinados. No entanto, o uso está na dependência de se encontrar um solvente que possa diminuir os custos na obtenção do extrato.

A atividade antimicrobiana de extrato de própolis (solução hidroalcoólica 60,0 – 93,8% v/v de álcool) com diferentes concentrações na composição fenólica foi avaliada em bactérias ruminais, obtendo-se uma inibição do crescimento das cepas *Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1, *Ruminococcus albus* 7, *Butyrivibrio fibrisolvens* D1, *Prevotella albensis* M384, *Peptostreptococcus* sp. D1, *Clostridium aminophilum* F e *Streptococcus bovis* Pearl 11. Enquanto as cepas *R. albus* 20, *Prevotella bryantii* B14 e *Ruminobacter amylophilus* H18, apresentaram resistência aos extratos (AGUIAR et al., 2013).

Os efeitos dos compostos fenólicos da própolis sobre os parâmetros digestivos e ruminais de vacas leiteiras foram pesquisados por Aguiar et al. (2014), utilizando quatro vacas fistuladas de primeira lactação, submetidas a tratamentos com diferentes concentrações de própolis: sem própolis; 3,81 mg de compostos fenólicos/kg de matéria seca (MS) ingerida; 3,27 mg de compostos fenólicos/kg de MS ingerida e 1,93 mg de compostos fenólicos/kg de MS ingerida e verificaram que a inclusão de 3,27 mg de compostos fenólicos/kg reduziu a produção de amônia ruminal, e a inclusão de 3,81 mg de compostos fenólicos/kg aumentou a digestibilidade intestinal de proteína bruta. Portanto, a inclusão de própolis em dietas para vacas leiteiras tem efeitos positivos sobre o metabolismo de proteínas no rúmen e a variação das quantidades de compostos fenólicos em diferentes produtos à base de própolis podem explicar os diversos efeitos sobre os parâmetros digestivos avaliados.

Os efeitos dos flavonoides foram estudados por Oskoueian et al. (2013), que verificaram que a inclusão de 4,5%, com base na matéria seca, de flavona, miricetina e kaempferol diminuíram a degradabilidade da matéria seca, com exceção da naringenina e quercetina, sendo que todos foram efetivos quanto a redução na produção de metano. A produção de gás *in vitro* foi diminuída pela flavona, miricetina e kaempferol, ao passo que a rutina e quercetina aumentaram a produção de gás total.

Com o objetivo de verificar o efeito da adição do extrato etanólico de própolis na alimentação de 20 vacas da raça Holandesa, Freitas et al. (2009) analisaram a produção de leite, teores de gordura e proteína do leite de vacas alimentadas sem (controle) e com a adição de 64 mL de extrato etanólico de própolis 30% peso/volume na dieta com um consumo diário de 19,2 g de extrato de própolis/animal/dia, verificando que a adição do extrato etanólico de própolis aumentou a produção de leite e teores de proteína, não apresentando efeito sobre os teores de gordura do leite.

O desempenho, a digestibilidade, a produção microbiana e as características de carcaça de bovinos confinados recebendo dietas contendo extrato de própolis foram estudados por Aguiar et al. (2012), utilizando 27 bovinos divididos em três tratamentos: duas dietas contendo própolis bruta (PBP 1, com 0,018 mg de flavonoides/g de produto; e PBP 2, com 0,036 mg de flavonoides/g de produto) e a dieta controle, sem adição de própolis e verificaram que a adição da própolis não teve efeito sobre a digestibilidade da matéria seca e de nutrientes (exceto para fibra em detergente ácido), eficiência na síntese microbiana e características de carcaça, o que foi atribuído à baixa dosagem.

O resíduo proveniente do processamento da própolis também tem sido testado na alimentação animal para verificar possível contribuição no sentido de diminuir as perdas de energia, bem como diminuir a poluição ambiental. Para verificar o efeito antimicrobiano de resíduos da própolis verde e da marrom, Heimbach et al. (2009) utilizaram cepas bacterianas de *Escherichia coli* e de *Staphylococcus aureus* e observaram que os resíduos da extração hidro alcoólica de própolis verde e marrom afetaram o crescimento de *Escherichia coli*, enquanto a inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* ocorreu somente pela ação do resíduo da extração da própolis verde.

Em estudo avaliando o efeito do produto Própolis (LLOS) sobre o consumo da matéria seca (MS), a digestibilidade dos nutrientes totais, as características ruminais e a eficiência microbiana em bubalinos alimentados com uma dieta baseada em volumoso (70% feno de *Cynodon* spp. e 30% concentrado), Costa Júnior et al. (2012) utilizaram quatro tratamentos

com três concentrações de LLOS: Controle (sem LLOS) , LLOS B3 + (0,272 mg/g flavonoides crisina), LLOS C1 (0,092 mg/g de flavonoides crisina) e LLOS C1 + (0,184 mg/g flavonoides crisina), sugerindo que LLOS C1 melhora o valor nutricional da alimentação dos búfalos, alterando a cinética de fermentação, porém a própolis LLOS em doses maiores não apresenta o mesmo efeito.

O rúmen é uma estrutura diversificada na qual encontram-se em simbiose diferentes grupos de microrganismos, entre os quais estão as bactérias metanogênicas que utilizam parte da energia dos nutrientes, produzindo metano e conseqüentemente, diminuindo a produtividade animal (KUMAR et al., 2009). O metano é produzido no rúmen e no intestino grosso de animais ruminantes por um grupo de *Archaea* conhecido coletivamente como metanogênicas, pertencentes ao filo Euryarcheota produtores de metano e de interesse na investigação de estratégias de redução desse gás (HOOK et al., 2010). O metano é o subproduto da digestão da biomassa vegetal pelos herbívoros. Na sua liberação há perdas de energia pelo animal e este gás contribui para as mudanças climáticas (KING et al., 2011).

Os intermediários da produção de amônia são os aminoácidos e os peptídeos, que são provenientes da quebra da proteína solúvel do alimento através de enzimas microbianas ruminais, sendo os mesmos incorporados à proteína microbiana ou desaminados. Porém, ao se ter uma quebra excessiva de peptídeos, os mesmos não são assimilados totalmente, ocorrendo uma perda desses na forma de amônia. Uma forma de reduzir a perda de nitrogênio pelo animal seria através da administração dos inibidores bacterianos, como a monensina e própolis (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2001).

Segundo Stradiotti Júnior et al. (2004b) a maior produção de propionato é benéfica, por disponibilizar no rúmen, menores quantidades de carbono e hidrogênio que seriam utilizados para a produção de metano. A menor produção de metano é sinônimo de aumento na eficiência energética, com conseqüente melhora no desempenho animal.

Com o objetivo de utilizar a técnica *in vitro* para medir a perda de potássio celular, Leopoldino et al. (2007) avaliaram a produção total de gases *in vitro* das rações com ou sem óleo de soja incubadas com monensina, lasalocida ou própolis e concluíram que as bactérias do rúmen de vacas submetidas a dietas que contenham lipídios ou monensina são mais resistentes à perda do potássio intracelular pela ação da lasalocida. Os antibióticos foram efetivos em reduzir o volume de gases, com maior ação da própolis. A própolis leva a redução de metano, o que resulta em diminuição da perda de energia para o meio.

Um método de avaliação interessante, também, para estudos com própolis foi desenvolvido por Pell; Schofield (1993), que desenharam um sistema fechado ligado a um sensor, sendo os dados enviados para um computador para serem armazenados para posterior análise. Theodorou et al. (1994) descreveram uma variante da técnica *in vitro* de produção de gás em que um transdutor de pressão foi utilizado para ler e libertar as pressões dos gases acumulados a partir das seringas de incubação. Uma discussão sobre a utilização da técnica de produção de gás *in vitro* e as estimativas dos parâmetros obtidos por modelos não lineares foi publicada por Schofield (2000).

Equações empíricas usando os resultados da produção de gás e da composição de alimentos foram usadas para estimar a energia metabolizável dos alimentos (MENKE; STEINGASS, 1988). Este sistema ainda é utilizado para determinar a dinâmica de fermentação, a biomassa microbiana, e os ácidos graxos voláteis (BLUMMEL et al., 1997).

Adicionalmente, os modelos podem assumir um, dois ou mais compartimentos e/ou fases de fermentação. Dessa forma, segundo Mello et al. (2008), quando os resultados forem analisados por modelos diferentes, os resultados também podem ser diferentes, exigindo cautela e bom senso em sua interpretação e julgamento.

As atividades biológicas da própolis têm sido comprovadas nas diferentes áreas, utilizando-se diferentes meios de extração, métodos de aplicação e quantidade do produto. Sendo sua atividade antibacteriana a mais estudada, aliada também, atualmente, à busca pela utilização de produtos naturais na produção animal. Dessa forma, pesquisas tem-se direcionado a utilização da própolis.

Diante do exposto, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana da própolis produzida no município de Terenos – MS, na saúde animal e na nutrição de ruminantes, e os resultados obtidos estão apresentados na forma de dois artigos intitulados “Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis produzida no município de Terenos – MS” e “Cinética da produção de gás e degradabilidade *in vitro* de rações contendo doses crescentes de extrato alcoólico de própolis marrom”, que estão redigidos de acordo com as normas de publicação do periódico Ciência Rural.

REFERÊNCIAS

- ALCARAZ, L. E.; BLANCO, S.E.; PUIG, O.N. et al. Antibacterial activity of flavonoids against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Journal of Theoretical Biology**, v.205, n.2, p.231-240, 2000.
- AGUIAR, S.C.; PAULA, E.M.; YOSHIMURA, E.H. et al. Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.43, n.4, p.197-206, 2014.
- AGUIAR, S.C.; ZEOULA, L.M.; FRANCO, S.L. et al. Antimicrobial activity of Brazilian propolis extracts against rumen bacteria *in vitro*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.29, n.10, p.1951-1959, 2013.
- AGUIAR, S.C.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Performance, digestibility, microbial production and carcass characteristics of feedlot young bulls fed diets containing propolis. **Acta Scientiarum**, v.34, n.4, p.393-400, 2012.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1, p.114-117, 2005b.
- BANKOVA, V. Review: recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.29-32, 2005a.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; STOEV, G. et al. Determination of phenolics from propolis by capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v.607, n.1, p.150-153, 1992.
- BANKOVA, V.; POPOVA, M.; BOGDANOV, S. et al. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.57, n.5/6, p.530-533, 2002.
- BANKOVA, V.S.; CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, n.1, p.3-15, 2000.
- BARTH, O.M.; DUTRA, V.M.L.; JUSTO, R.L. Análise polínica de algumas amostras de própolis do brasil meridional. **Ciência Rural**, v.29, n.4, p.663-667, 1999.
- BARTH, O.M.; FREITAS, A.S.; MATSUDA, A.H. et al. Botanical origin and Artepillin-C content of Brazilian propolis samples. **Grana**, v.52, n.2, p.129-135, 2013.
- BLÜMMEL, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. *In vitro* gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v.77, p.24-34, 1997.
- BORGES, E.C.; SILVA, L.C.; ALENCAR, S.M. et al. Caracterização química de extratos etanólicos de própolis com atividade inibitória do crescimento de estafilococos isolados de mastite bovina. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.8, n.1, p.1040-1153, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Instrução Normativa n.3, de 19 de Janeiro de 2001. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**, 2001. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>>. Acesso em: 07 de novembro 2013.

BURDOCK, G.A. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.4, p.347-363, 1998.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E.M. 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, I.S.R. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 2008.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; ALENCAR, S.M. et al. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.3, p.557-564, 2012.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.

CASTRO, M.L.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L. et al. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Química Nova**, v.30, n.7, p.1512-1516, 2007.

COSTA JÚNIOR, J.B.G.; ZEOULA, L.M.; FRANCO, S.L. et al. Effect of propolis product on digestibility and ruminal parameters in buffaloes consuming a forage-based diet. **Italian Journal of Animal Science**, v.11, n.78, p.441-448, 2012.

CUNHA, I.B.S.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, F.M. et al. Factors that influence the yield and composition of brazilian propolis extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.15, n.6, p.964-970, 2004.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Review: Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, n.1, p.343–356, 2005.

DAUGSCH, A.; MORAIES, C.S.; FORT, P. et al. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

DIERCKX, S.M.A.G.; FUNARI, S.R.C. Uso da própolis na alimentação de leitões desmamados como aditivo e na prevenção à diarreia. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v.7, n.2, p.109-116, 1999.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v.12, n.5, p.1157-1161, 1973.

FAUSTINO, C.M.; GOMES, M.F.F. Levantamento da flora apícola situada na Fazenda-Escola Terenos/MS. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 48, 1996, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SBPC, 1996. p.1.

FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; LUZ, C.F.P. Própolis marrom da vertente atlântica do Estado do Rio de Janeiro, Brasil: uma avaliação palinológica. **Revista Brasileira Botânica**, v.33, n.2, p.341-352, 2010.

FREITAS, A.S.; BARTH, O.M.; SALES, E.O. et al. A Apalynological analysis of Brazilian propolis samples. **Journal of ApiProduct and ApiMedical Science**, v.3, n.2, p 67-74, 2011.

FREITAS, J.A.; ANTONANGELO, R.P.; RIBEIRO, J.L. et al. Extrato etanólico de própolis na alimentação de vacas leiteiras. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, n.2, p.333-343, 2009.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GONSALES, G.Z.; ORSI, R.O.; 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.

HEIMBACH, N.S.; ÍTAVO, C.C.B.F.; LEAL, C.R.B. et al. Estudo antimicrobiano do resíduo da extração de própolis. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2009, **Anais...** Águas de Lindóia: Associação Brasileira de Zootecnistas, resumos, 2009.

HOGENDOORN, E.A.; SOMMEIJER, M.J.; VREDENBREGT, M.J. Alternative method for measuring beeswax content in propolis from the Netherlands. **Journal of Apicultural Science**, v.57, n.2, p.81-90, 2013.

HOOK, S.E.; WRIGHT, A.D.G.; MCBRIDE, B.W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, v.2010, p.1-11, 2010.

ÍTAVO, C.C.B.F.; MORAIS, M.G.; COSTA, C. et al. Addition of propolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feelot. **Animal Feed Science and Techonology**, v.165, p.161-166, 2011.

KING, E.E.; SMITH, R.P.; ST-PIERRE, B. et al. Differences in the rumen methanogen populations of lactating Jersey and Holstein dairy cows under the same diet regimen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.77, n.16, p.5682-5687, 2011.

KUJUMGIEV, A.; TSVETKOVA, I.; SERKEDJIEVA, Y.U. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.

KUMAR, S.; PUNIYA, A.K.; PUNIYA, M. et al. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.25, n.9, p.1557-1566, 2009.

KORN, M.G.A.; GUIDA, M.A.B.; BARBOSA, J.T.P. et al. Evaluation of sample preparation procedures for trace element determination in Brazilian propolis by inductively coupled plasma optical emission spectrometry and their discrimination according to geographic region. **Food Analytical Methods**, v.6, p.872-880, 2013.

KUMAZAWA, S.; UEDA, R.; HAMASAKA, T. et al. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7722-7725, 2007.

LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; QUEIROZ, A.C. et al. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.2, p.650-658, 2005.

LEOPOLDINO, W.M.; LANA, R.P.; EIFERT, E.C. et al. Avaliação de ionóforos pela técnica da perda do potássio celular e produção de gases *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.6, p.1516-1522, 2007.

LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C. et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.447-454, 2008.

LUZ, C.F.P.; BARTH, O.M.; BACHA JUNIOR, G.L. Análise palinológica de própolis vermelha do Brasil: subsídios para a certificação de sua origem botânica e geográfica. **Revista Mensagem Doce (Associação Paulista de Apicultores, Criadores de Abelhas Melíferas Europeias)**, v.102, p.10-15, 2009.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**, n.26, v.1, p.83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996.

MARCUCCI, M.C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.105-112, 2001.

MARCUCCI, M.C.; WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonoides. **Mensagem Doce**, n.46, p.3-11, 1998.

MARTINEZ, O.A.; SOARES, A.E.E. Melhoramento genético na apicultura comercial para produção da própolis. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.13, n.4, p.982-990, 2012.

MELLO, R.; MAGALHÃES, A.L.R.; BREDAS, F.C. et al. Modelos para ajuste da produção de gases em silagens de girassol e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.2, p.261-269, 2008.

MENDONÇA, L.S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados à própolis vermelha**. 2011. 67 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Programa de Pós Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE, 2011.

MENKE, K.H.; STEINGASS, H. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. **Animal Research and Development**, v.28, p.7-55, 1988.

MIRZOEVA, O. K.; GRISHANIN, R. N.; CALDER, P.C. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997.

MORAES, C.S. **Isolamento e identificação de formononetina da própolis de João Pessoa - PB, estudo de sua sazonalidade e avaliação de suas atividades biológicas**. 2009. 188 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2009.

MORSY, A.S.; ABDALLA, A.L.; SOLTAN, Y.A. et al. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. **Tropical Animal Health and Production**, v.45, n.7, p.1609-1618, 2013.

MULI, E. M.; MAINGI, J. M. 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.3, p.655-663, 2007.

ORSI, R.O.; SFORCIN, J.M.; FUNARI, S.R.C. et al. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v.5, p.359–368, 2005.

OLIVEIRA, J.S.; LANA, R.P.; BORGES, A.C. et al. Efeito da monensina e extrato de própolis sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.504-510, 2004.

OLIVEIRA, J.S.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.275-281, 2006.

OSKOEI, E.; ABDULLAH, N.; OSKOEI, A. Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-8, 2013.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.A.; SCAMPARINI, A.R.P. 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, 2002a.

PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.50, p.2502-2506, 2002b.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; ABREU, J.A.S. et al. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Current Microbiology**, v.36, n., p.24-28, 1998.

PAULINO, N.; DANTAS, A.P.; BANKOVA, V. et al. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits *in vitro* contraction of airway smooth muscle. **Journal of pharmacological sciences**, v.93, n.3, p.307-313, 2003.

PELL, A.N., SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1063-1073, 1993.

PEREIRA, A.S.; SEIXAS, F.R.M.S.; AQUINO NETO, F.R. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, p.321-326, 2002.

POPOVA, M.; DIMITROVA, R.; AL-LAWATI, H.T. et al. Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. **Chemistry Central Journal**, v.7, n.1, p.158, 2013.

PORTILHO, D.R.; MELO, I.A.; GUERRA, R.C. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no Estado de Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v.6, n.2, p.1-8, 2013.

RÍSPOLI, T.B.; RODRIGUES, I.L.; MARTINS NETO, R.G. et al. Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.1, p.92-97, 2009.

RUSSELL, J.B.; STROBEL, H.J. Effect of ionophores on ruminal fermentation. **Applied Environmental Microbiology**, v.55, n.1, p.1-6, 1989.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E.W.; NEGRI, G. et al. Review: origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.2, n.1, p.33-38, 2005.

SCHOFIELD, P. Gas production methods. **Farm animal metabolism and nutrition**. p. 209-232, 2000.

SERRA BONVEHÍ, J.; COLL, F.V.; JORDÀ, R.E. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, p.529-532, 1994.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.253-260, 2011.

SILICI, S.; KUTLUCA, S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. **Journal of Ethnopharmacology**, v.99, n.1, p.69-73, 2005.

SILVA, B.B.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A. et al. Composição química e origem botânica da própolis vermelha, um novo tipo de própolis brasileira. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.3, p.313-316, 2008.

SILVA, C.S.R.; VILLAÇA, C.L.P.B.; PEIXOTO, R.M. et al. Antibacterial effect of brazilian brown propolis in different solvents against *Staphylococcus* spp. isolated from caprine mastitis. **Ciência Animal Brasileira**, v.13, n.2, p.247-251, 2012.

SIRIPATRAWAN, U.; VITCHAYAKITTI, W.; SANGUANDEEKUL, R. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**, v.48, p.22-27, 2013.

SOUZA, E.A.; INOUE, H.T.; GOMES, S.M.A. et al. Propriedade físico-química da própolis em função da sazonalidade e método de produção. **Archivos de Zootecnia**, v.59, n.228, p.571-576, 2010.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R. P. et al. Ação da própolis sobre microorganismos ruminais e sobre alguns parâmetros de fermentação no rúmen. In: 38. Reunião Anual da SBZ, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.942-944, 2001.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P. et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1093-1099, 2004a.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R. P. et al. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.4, p.1086-1092, 2004b.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.487, n3-4, p.185-197, 1994.

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

WINN JR., W.C.; ALLEN, S.; KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1465p.

ZHANG, C.P.; ZHENG, H.Q.; HU, F.L. Extraction, partial characterization, and storage stability of β -glucosidase from propolis. **Journal of Food Science**, v.76, n.1, p.C75-C79, 2011.

ZAWADZKI, F.; PRADO, I.N.; MARQUES, J.A. et al. Sodium monensin or propolis extract in the diets of feedlot-finished bulls: effects on animal performance and carcass characteristics. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v.20, n.1, p.16-25, 2011.

Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom produzida no Município de Terenos – MS

"*In vitro*" biological activity of brown propolis produced in Terenos city - MS

RESUMO

Objetivou-se avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom produzida em Terenos - MS, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de sensibilidade por microdiluição. O teste de sensibilidade foi realizado em placas de titulação com 96 poços. As concentrações do extrato de própolis (35 g de própolis bruta e 65 mL de álcool de cereais, com 27,65 mg/mL de fenóis totais e 13,98 mg/mL de flavonoides totais), usadas foram: 75 mg/mL; 56,4 mg/mL; 37,5 mg/mL; 18,9 mg/mL; 9,3 mg/mL; 4,5 mg/mL e 2,25 mg/mL. Foram utilizados 32 isolados de bactérias Gram-positivas: *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., e 32 isolados de bactérias Gram-negativas: *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. e *Serratia rubidaea*, provenientes de processos clínicos infecciosos de animais domésticos, obtidas e armazenadas no Laboratório de Bacteriologia da FAMEZ/UFMS. O extrato de própolis apresentou atividade antimicrobiana com CIM variando de 2,25 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-positivas e 4,5 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-negativas, sendo as bactérias provenientes de bovinos e caninos as mais resistentes. Conclui-se que a própolis marrom obtida em Terenos – MS tem ação bactericida, em função da espécie da bactéria e da procedência animal.

Palavras-chave: bactérias, bactericida, Concentração Inibitória Mínima.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the in vitro antibacterial activity of brown propolis produced in Terenos city - MS, by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) by the technique of sensitivity by microdilution. The sensitivity test was performed in 96 well microtiter plates. Dilutions of propolis extracts used were: 75 mg/mL; 56.4 mg/mL; 37.5 mg/mL; 18.9 mg/mL; 9.3 mg/mL; 4.5 mg/mL and 2.25 mg/mL. The alcoholic extract of propolis was obtained from 35 g of crude propolis macerated in 65 mL of alcohol. Thirty-two Gram-positive bacteria isolates were used: *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus* spp. and *Streptococcus* spp.; and the thirty-two Gram-negative bacteria isolated were: *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. and *Serratia rubidaea*. The samples of bacteria were obtained from infectious clinical processes of domestic animals. They were stored in the laboratory of Bacteriology FAMEZ / UFMS. These samples were kept frozen at -20 °C with glycerol criopreservante v/v. The brown propolis extract showed antibacterial activity with MIC ranging from 2.25 to 18.9 mg/ml for Gram-positive bacteria and 4.5 to 18.9 mg/ml for Gram-negative bacteria, being derived from bacteria more resistant cattle and dogs. It was concluded that brown propolis has antibacterial action, but the effect depends on the species of the bacterium and its origin.

Keywords: bacteria, bactericidal, Minimum Inhibitory Concentration.

INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa que as abelhas coletam de diversas partes das plantas, como brotos, botões florais, cascas e exsudatos resinosos (PARK et al., 1998; PEREIRA et al., 2002). As abelhas utilizam a própolis para fechar pequenos orifícios,

mumificar insetos que morrem no interior da colmeia, defender contra invasão de microrganismos, fortalecer os favos e proteger a entrada das colmeias (MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al., 2000).

A própolis tem sido empregada como um importante fitoterápico devido aos estudos que revelaram seu potencial antibacteriano, anti-inflamatório, antiviral, antifúngico e imunomodulatório (CASTRO, 2001; SFORCIN & BANKOVA, 2011; CABRAL et al., 2012; PORTILHO et al., 2013). Também, apresenta propriedades fármaco-terapêuticas que a coloca como possível alternativa ao uso dos antibióticos. No entanto, há necessidade de uma padronização das doses e dos extratos (COELHO et al., 2010).

Em toda a extensão do território brasileiro são encontradas plantas apícolas produtoras de substrato para a composição e síntese de própolis. A grande diversidade dessas plantas, a época de coleta da resina, a genética das abelhas e a região geográfica proporcionam à própolis uma variada composição química (MARCUCCI, 1996; BANKOVA et al. 2000; ORSI et al., 2005; GONSALES et al., 2006; DAUGSCH et al., 2008). As propriedades químicas da própolis apresentam importante valor farmacológico como um complexo natural e não como uma fonte de compostos que atuam isoladamente (KUJUMGIEV et al., 1999).

O Estado de Mato Grosso do Sul possui uma rica flora apícola, da qual as abelhas podem coletar a própolis (FAUSTINO & GOMES, 1996). No entanto, poucos trabalhos se referem à composição química e à ação microbiológica da própolis produzida pela vegetação dessa região.

Diante do exposto, realizou-se este trabalho com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana da própolis produzida no município de Terenos – MS, Estado de Mato Grosso do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extrato de Própolis

A própolis bruta foi coletada das colmeias de abelha *Apis mellifera*, instaladas em apiário na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, situada no município de Terenos/MS. (20°26'34.31''S 54°50'27.86''O, com 530,7 m de altitude). Para produção da própolis, entre os meses de maio a agosto, foram colocadas telas de nylon entre a melgueira e a tampa. Após 45 dias as telas foram removidas, embaladas e transportadas até o laboratório de Apicultura da FAMEZ/UFMS, em Campo Grande, MS. A própolis foi proveniente da florada de plantas apícolas da região: *Luehea* sp. (açoita-cavalo), *Piptadenia falcata* (angico-do-cerrado), *Tabebuia* spp. (ipês), *Tabebuia caraíba* (para-tudo), predominando a *Vernonia* spp. (assa-peixes) e a *Cecropia pachystachya* (embaúba).

Para obtenção do extrato alcoólico de própolis, foram utilizadas 35 g da própolis bruta com agitação diária durante 45 dias em 65 mL de álcool de cereais. Posteriormente foi filtrada em papel de filtro, obtendo-se uma solução estoque, armazenada em frascos âmbar e mantida em temperatura ambiente. Analisaram-se os parâmetros físico-químicos (cera, resíduo seco, fenóis totais e flavonoides totais) adotados pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001), segundo a metodologia descrita por FUNARI & FERRO (2006).

2.2 Amostras de bactérias

Todas as amostras de bactérias utilizadas neste estudo foram provenientes da micoteca do Laboratório de Bacteriologia da FAMEZ/UFMS. As amostras foram obtidas de processos clínicos infecciosos de animais domésticos, sendo mantidas congeladas a -20°C, com criopreservante glicerol, na proporção v/v. Foram usadas 32 amostras de Gram-positivas e 32 amostras de Gram-negativas. A identificação das amostras, a espécie animal de origem e

o número de isolados, estão demonstrados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente, para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2.3 Atividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis

A atividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis foi investigada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela técnica de sensibilidade por microdiluição em caldo, segundo protocolo descrito por WINN JR. et al. (2008), com modificações.

As amostras bacterianas foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e o teste de pureza e viabilidade realizado em Agar BHI. Foram escolhidas algumas colônias bem isoladas que foram repicadas em caldo BHI. A padronização do inóculo foi realizada pela equiparação da turvação do repique com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland, que corresponde ao número de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL.

O ensaio de sensibilidade foi executado em placas de microtitulação de 96 poços. As diluições do extrato de própolis usadas foram: 75 mg/mL, 56,4 mg/mL, 37,5 mg/mL, 18,9 mg/mL, 9,3 mg/mL, 4,5 mg/mL e 2,25 mg/mL. A cada poço foram adicionados 10 μ L do inóculo bacteriano. Controles foram usados empregando o inóculo bacteriano e álcool de cereais. Os ensaios foram realizados em duplicata/microrganismo/tratamento.

As placas contendo inóculo, e as diferentes concentrações do extrato, foram incubadas em estufa a 37°C por uma noite. Após esta etapa todos os poços foram semeados em placas de ágar BHI as quais foram incubadas a 37°C por uma noite. A leitura das placas foi realizada pela observação do crescimento das colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato alcoólico de própolis 35% apresentou 29,90 mg/mL de cera, 151,28 mg/mL de resíduo seco, 13,95 mg/mL de flavonoides totais e 27,65 mg/mL de fenóis totais. O

teor de compostos fenólicos do extrato de própolis marrom deste ensaio é semelhante aos 2,61% (26,1 mg/mL), encontrado no extrato de própolis proveniente de Prudentópolis – PR analisado por BURIOL et al. (2009), entretanto o teor de flavonóides é superior aos 0,46% (4,6 mg/mL). Há de se destacar que ambos os extratos estão dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, na qual o teor de flavonoides da própolis é de 0,25% - mínimo (2,5 mg/mL) e para os compostos fenólicos 0,50% - mínimo (5,0 mg/mL) (BRASIL, 2001).

Foi verificado que o extrato alcoólico de própolis apresentou atividade antimicrobiana para todas as bactérias Gram-positivas (Tabela 1) e Gram-negativas (Tabela 2) utilizadas nesta pesquisa, no entanto, com diferentes CIM, dependendo da espécie e do isolado.

Para as bactérias Gram-positivas, a CIM do extrato alcoólico de própolis variou de 2,25 a 18,5 mg/mL. A menor CIM do extrato alcoólico de própolis capaz de inibir o crescimento de *Streptococcus* spp. de procedência bovina foi 2,25 mg/mL. Para as bactérias do gênero *Staphylococcus*, também de procedência bovina a CIM foi 9,3 mg/mL, indicando maior resistência desse gênero ao extrato de própolis quando comparada ao gênero *Streptococcus*, o que é esperado, uma vez que bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem maior habilidade em desenvolver resistência a compostos em geral, sendo utilizada como um microrganismo de referência em testes de resistência.

BURIOL et al. (2009), estudando o extrato de própolis (5g de própolis bruta e 25 mL de etanol), encontraram atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*.

Resultados positivos também foram encontrados por SAEKI et al. (2011), em que o extrato alcoólico de própolis a 30% foi eficaz contra *Staphylococcus aureus* proveniente de animais portadores de mastite, apresentando um halo de inibição entre 6 – 18 mm, sugerindo como alternativa ao uso dos antibióticos comerciais. Apesar da técnica de difusão de discos ser amplamente utilizada para ensaios antibacterianos, tal técnica possui como limitação o

fato de não indicar a quantidade exata do composto necessária pra inibir uma determinada concentração bacteriana.

SERRA BONVEHÍ et al. (1994) encontraram ação bactericida da própolis bruta, de origem brasileira, para *Staphylococcus aureus* com uma CIM de 0,1 mg/mL, valor inferior aos 9,3 mg/mL encontrados neste ensaio, o que demonstra maior atividade inibitória da própolis testada por estes autores. Vale ressaltar que no presente ensaio, a procedência clínica dos microrganismos testados pode ter influenciado na eficácia da inibição do crescimento bacteriano.

Nesse trabalho verificou-se que, o extrato alcoólico de própolis 35% apresentou ação antibacteriana com concentração inibitória mínima variando de 4,5 a 18,9 mg/mL para *Escherichia coli* e de 4,5 a 9,3 mg/mL para *Pseudomonas aeruginosa*. Valores com concentrações inibitórias superiores foram encontrados por SFORCIN et al. (2000), usando extrato de própolis 30%, sendo a CIM de 5,70% (57 mg/mL) para *Pseudomonas aeruginosa* e de 6,33 – 8,00% (63,3 – 80,0 mg/mL) para *Escherichia coli*, o que pode estar relacionado ao fato das amostras de bactérias serem provenientes de pacientes humanos, provavelmente, em tratamento, o que torna estes isolados com possibilidade de apresentação de maior resistência a antimicrobianos.

Estes valores foram superiores aos encontrados para as bactérias Gram-positivas, o que é esperado, considerando-se que a parede celular das bactérias Gram-negativas é mais fina que a das bactérias Gram-positivas, porém mais complexa, devido ao lipopolissacarídeo (LPS), sendo a ação sobre este tipo de estrutura um desafio para os testes com antibacterianos (WINN JR. et al., 2008).

Ainda de acordo Winn Jr. et al. (2008), as porinas são proteínas encontradas nas bactérias Gram-negativas que formam canais transmembrana na membrana externa, através dos quais materiais de peso molecular mais baixo (aminoácidos, açúcares e íons) podem

passar para o espaço periplásmico e muitas dessas porinas têm uma estrutura “trimérica” que formam um poro. As porinas também ajudam a limitar a passagem de muitos fármacos antimicrobianos para o interior da célula.

As investigações realizadas por MIRZOEVA et al. (1997) corroboram com os resultados obtidos nesse estudo, onde foi verificado que o extrato de própolis apresentou atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-negativas, utilizando concentração entre 4,5 e 18,9 mg/mL do extrato de própolis e frente às bactérias Gram-positivas apresentou menor CIM, entre 2,25 a 18,9 mg/mL.

SIRIPATRAWAN et al. (2013), utilizando própolis tailandesa extraída com etanol 30, 40, 50%, verificaram que os extratos de própolis demonstraram atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* TISTR 118, no entanto, não exibindo halo de inibição com extrato 70% e, nenhuma dessas concentrações apresentou efeito inibitório frente a *Escherichia coli* TISTR 780, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Salmonella enteritidis* DMTS 17368. Já ORSI et al. (2005), utilizando extratos de própolis provenientes de duas regiões do Brasil, verificaram efeito bactericida do extrato de própolis frente à *Salmonella* spp, assim como neste ensaio, no qual obteve-se CIM entre 4,5 a 9,3 mg/mL (Tabela 2).

De acordo com STEPANOVIC et al. (2003), independentemente da resistência microbiana aos antibióticos, o extrato de própolis (2 g própolis bruta e 10 mL etanol 95%) mostrou significativa atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (CIM 0,78 mg/mL a 12,5 mg/mL de extrato etanólico de própolis), enquanto as bactérias Gram-negativas foram menos suscetíveis (12,5 mg/mL a > 50 mg/mL de extrato etanólico de própolis). Os valores encontrados por estes autores para *Staphylococcus aureus* foram entre 0,78 mg/mL e 3,1 mg/mL, inferiores aos obtidos no presente trabalho (Tabela 1). Já para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, STEPANOVIC et al. (2003) encontraram 12,5 mg/mL e > 50

mg/mL, respectivamente, ambos valores superiores aos encontrados no presente estudo (Tabela 2).

A própolis apresentou ação bactericida com diferentes CIM frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Tabelas 1 e 2), conferindo a própolis desta região uma possível aplicação como substância antibacteriana.

Bactérias de procedência bovinas e caninas apresentaram maior resistência, provavelmente pelo histórico de tratamento destes animais, marcado pelo uso indiscriminado de antimicrobiano, acarretando seleção de populações bacterianas mais resistentes.

O emprego da própolis como antibiótico natural seria possivelmente mais viável para o tratamento de infecções provocadas por bactérias Gram-positivas, com formulações que permitissem o uso tópico, a exemplo do que é praticado em infecções da via respiratória superior e na odontologia, uma vez que já foram realizadas pesquisas com o extrato etanólico de própolis, sendo verificada a inibição da atividade do microrganismo *Streptococcus mutans* causador da cárie dentária (PARK et al., 1998; ALVES et al., 2006) ou como extrato hidrossolúvel de própolis na pré e pós-imersão dos tetos de bovinos leiteiros na prevenção da mastite bovina (ANDRADE, 2010).

CONCLUSÃO

A própolis marrom produzida em Terenos – MS, utilizada como extrato alcoólico 35%, tem ação bactericida frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas utilizadas neste estudo, apresentando diferentes concentrações inibitórias mínimas, dependendo da espécie, do microrganismo e de sua procedência, sendo as de origem bovina e canina as mais resistentes.

REFERÊNCIAS

- ALVES, F.B.C. et al. Eficiência de soluções aquosas e hidroalcoólicas da própolis do Vale da Paraíba sobre cepas *Streptococcus mutans*. **Revista Biociência**, v.12, n.1-2, p.74-81, 2006.
- ANDRADE, U.V.C. **Potencial antibacteriano do extrato hidrossolúvel de própolis obtido por hidrólise alcalina para a inibição de cultivos de *Staphylococcus aureus* e higienização de pré e pós – imersão de tetos de vacas leiteiras**. 2010. 85f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná.
- BANKOVA, V.S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000102>>. Acesso em: 5 mar. 2013. doi: 10.1051/apido:2000102.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Instrução Normativa n.3, de 19 de Janeiro de 2001. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**, 2001. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>>. Acesso em: 07 nov. 2013.
- BURIOL, L. 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. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n2/v32n2a06.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2013.
- CABRAL, I.S.R. et al. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.48, n.3, p.557-564, 2012.
- CASTRO, S. L. Propolis: biological and pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee-product. **Annual Review of Biomedical Sciences**, v.3, p.49-83, 2001. Disponível em: <

<http://132.248.9.34/hevila/ARBSAnnualreviewofbiomedicalsciences/2001/vol3/2.pdf>>.

Acesso em: 01 jul. 2014.

COELHO, M. S. et al. A própolis e sua utilização em animais de produção. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.98, 2010. Disponível em: <

http://www.uco.es/organiza/servicios/publica/az/php/img/web/02_11_22_1640REVISIONARopolisCoelhoB.pdf>. Acesso em: 5 mar. 2014.

DAUGSCH, A. et al. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.4, p.435-441, 2008.

Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2008/754625/abs/>>. Acesso: 12 de mai. 2013. doi: 10.1093/ecam/nem057.

FAUSTINO, C.M.; GOMES, M.F.F. Levantamento da flora apícola situada na Fazenda-Escola Terenos/MS. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 48, 1996, São Paulo, SP. **Anais...** São Paulo: SBPC, 1996. p. 1.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006. Disponível em:< <http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28867.pdf>>. Acesso em: 12 de ago. 2013.

GONSALES, G.Z. 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. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jvatitd/v12n2/v12n2a09>>. Acesso em: 17 fev. 2014.

KUJUMGIEV, A. et al. Antibacterial, antifungal, and antiviral activity of propolis of different geographic origin. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, n.3, p.235-240, 1999.

Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198001317>>.

Acesso em: 5 mar. 2013. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00131-7.

MARCUCCI, M.C. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química Nova**, v.19, n.5, p.529-536, 1996. Disponível em: <http://qnesc.yordan.com/qn/qnol/1996/vol19n5/v19_n5_12.pdf>. Acesso em: 12 mar. 2013.

MIRZOEVA, O. K. et al. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. **Microbiological Research.**, v.152, p.239-246, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501397800341>>. Acesso em: 15 out. 2013. doi: 10.1016/S0944-5013(97)80034-1.

ORSI, R.O. et al. Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.11, p.109-116. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1678-91992005000200003&script=sci_arttext>. Acesso em: 19 jul. 2014. doi: 10.1590/S1678-91992005000200003.

PARK, Y.K. et al. Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms. **Current Microbiology**, v.36, n., p.24-28, 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s002849900274>>. Acesso em: 27 mai. 2014. doi: 10.1007/s002849900274.

PEREIRA, A.S. et al. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v.25, p.321-326, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25n2/10460.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2014.

PORTILHO, D.R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica da própolis produzida no Estado de Tocantins. **Revista Científica do ITPAC**, v.6, n.2, p.1-8, 2013.

SAEKI, E.K. et al. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, p.284-

290, 2011. Disponível em: < <http://200.137.6.4/revistas/index.php/acta/article/view/2172>>.

Acesso em: 20 set. 2013.

SERRA BONVEHÍ, J. et al. The composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, p.529-532,

1994. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF02540666>>. Acesso em: 12 jun. 2013. doi: 10.1007/BF02540666.

SFORCIN, J. M. et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1, p.243-249, 2000. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100003202>>. Acesso em: 20 mai. 2014. doi: 10.1016/S0378-8741(00)00320-2.

SFORCIN, J.M.; BANKOVA, V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.2, p.253-260, 2011.

SIRIPATRAWAN, U. et al. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. **International Journal of Food Science and Technology**,

v.48, p.22-27, 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x/full>>. Acesso em: 15 set. 2013. doi: 10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x

STEPANOVIĆ, S. et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiological Research**, v.158, n.4, p. 353-357, 2003.

Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501304701391>>.

Acesso em: 23 jul. 2013. doi: 10.1078/0944-5013-00215.

WINN JR., W.C. et al. **Diagnóstico Microbiológico**: texto e atlas colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1465p.

Tabela 1 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato alcoólico de própolis produzida em Terenos – MS, frente às bactérias Gram-positivas

Bactérias	Procedência	Nº de isolados	CIM (mg/mL)
<i>Rhodococcus equi</i>	Equina	1	9,30
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bovina	3	9,30 (2/3) 18,90 (1/3)
	Camundongo	1	4,50
<i>Staphylococcus hyicus</i>	Canina	1	4,50
<i>Staphylococcus</i> spp.	Bovina	1	9,30
	Canina	21	2,25 (9/21) 4,50 (7/21)
			9,30 (4/21) 18,90 (1/21)
	Felina	1	2,25
Camundongo	1	9,30	
<i>Streptococcus</i> spp.	Bovina	1	2,25
	Equina	1	2,25

Tabela 2 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato alcoólico de própolis produzida em Terenos – MS, frente às bactérias Gram-negativas

Bactérias	Procedência	Nº de isolados	CIM (mg/mL)
<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bovina	2	9,30
	Suína	1	9,30
<i>Escherichia coli</i>	Ave	1	9,30
	Bovina	7	9,30 (5/7) 18,90 (2/7)
	Canina	3	4,50
	Felina	1	4,50
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Canina	2	4,50 - 18,90
	Felina	1	4,50
	ATCC 13883	1	4,50
<i>Klebsiella</i> sp.	Felina	1	9,30
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Felina	3	4,50 (1/3) 9,30 (2/3)
<i>Pseudomonas</i> spp.	Bovina	2	9,30
	Canina	3	4,50 (1/3) 9,30 (2/3)
<i>Salmonella</i> spp.	Alimento	1	9,30
	Equina	1	9,30
	Bovina	1	4,50
<i>Serratia rubidaea</i>	Felina	1	9,30

ATCC 13883=American Type Culture Collection

Cinética da produção de gás e degradabilidade *in vitro* de rações contendo doses crescentes de extrato alcoólico de própolis marrom

Gas production kinetics and degradability for *in vitro* fermentation of rations containing increasing levels of brown propolis alcoholic extract

RESUMO

Objetivou-se avaliar a inclusão do extrato alcoólico de própolis marrom em quatro diluições e doses (4; 8; 12; 16 e 20 mL/kg de MS de ração) sobre a fermentação ruminal por meio da produção de gases *in vitro* ajustada nos modelos Logístico Bicompartimental e Exponencial. A dieta foi composta por 400 g/kg de feno de capim-Tifton e de 600 g/kg concentrado. As amostras foram incubadas por 96 horas. O delineamento estatístico foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, com quatro diluições e cinco doses, em triplicata. Houve interação significativa entre tratamento e dose para degradabilidade da MS. A degradabilidade da matéria seca do tratamento sem aditivo foi 678,55 g/kg. O Tratamento Álcool-puro apresentou efeito exponencial negativo com 303,61 g/kg para a dose de 20 mL/kg MS. O Extrato-100% apresentou os maiores valores de degradabilidade, com máximo estimado em 18,93 mL/kg MS. O Extrato-70% apresentou mínima de 6,35 mL/kg MS e o Extrato-50% 7,65 mL/kg MS. Houve efeito de tratamento e de dose sobre a produção de gases. O Tratamento Álcool-puro apresentou potencial de redução de -0,32 mL de gás para cada mL de álcool adicionado para os dois modelos. No Extrato-70% as máximas estimativas de produção de gases em função da dose foram 11,43 mL e 12,60 mL de gás para os modelos Bicompartimental e Exponencial, respectivamente. No Extrato-100% as máximas foram 13,10 mL e 12,07 mL de extrato, respectivamente, com as maiores estimativas de produção de gases, com valores acima de 30 mL de gás/100mg de MS fermentada. O extrato de própolis

tem ação positiva sobre a degradação da MS e produção de gases. Sugere-se a utilização de 13 mL do extrato alcoólico de própolis (obtido a partir de 35g de própolis macerada em 65 mL de álcool de cereais)/kg de MS de para rações com relação volumoso:concentrado igual a 40:60.

Palavras-chave: aditivo, própolis, produção de gases *in vitro*, ruminantes.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the inclusion of alcoholic extract of brown propolis in four dilutions in water (0-50-70-100%) and doses (4, 8, 12, 16 and 20 mL/kg DM diet) through the production *in vitro* gas adjusted models Bicompartimental Logistic and Exponential. The feed was composed of 400 g/kg Tifton hay and 600 g/kg of concentrate. The samples were incubated for 96 hours. The statistical design was a completely randomized factorial design with four dilutions and five doses in triplicate. There was a significant interaction between dilution and dose for DM degradability. The degradability of DM the treatment without additive was 678.55 g/kg. Alcohol-pure treatment showed a negative exponential effect with 303.61 g/kg for the dose of 20 mL/kg DM. The Extract-100% showed the highest values of degradability, with maximum estimated at 18.93 mL/kg DM. The Extract-70% showed minimum of 6.35 mL/kg DM and Extract-50% 7.65 mL/kg DM. There was effect of treatment and dose on the production of gases. The Alcohol pure Treatment presented reduction potential of -0.32 mL gas for each mL of alcohol added. For the Extract-70% the value maximum estimate was 11.43 mL and 12.60 mL for the models Bicompartimental Logistic and Exponential, respectively. For Extract 100% on-peak was 13.10 mL and 12.07 mL of extract, respectively, with the highest estimates of gas production, with values above 30 mL gas/100mg DM fermented. Propolis extract had a positive action on the degradation and gas production. It's possible to suggest using 13 mL of alcoholic extract

of propolis (obtained from 35g of macerated propolis in 65 mL of alcohol)/ kg DM of diets with proportion roughage:concentrate equal 40:60.

Keywords: additive, propolis, *In vitro* gas production, ruminants.

INTRODUÇÃO

A própolis é um produto natural, que tem ação antimicrobiana (PARK et al., 2000; STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004b), com uma composição química bastante complexa e variada e intimamente relacionada à ecologia da flora visitada pelas abelhas (GHISALBERTI, 1979).

Segundo MIRZOEVA et al. (1997), a própolis e alguns de seus componentes (ácido cafeico fenil éster - CAPE e quercetina) tem ação bacteriostática sobre bactérias Gram-positivas e algumas Gram-negativas, aparentemente pela modificação do status bioenergético da membrana bacteriana e pela inibição de sua motilidade, o que remete à atividade dos ionóforos. Os ionóforos são aditivos utilizados na manipulação do ambiente ruminal que proporcionam uma melhor utilização da energia metabólica e diminuição da concentração de lactato e da desaminação proteica pelos ruminantes (PRADO et al., 2010).

A própolis tem sido utilizada como aditivo na nutrição de ruminantes, apresentando uma ação ionófora, inibindo a produção de gases, principalmente do metano, e reduzindo as perdas de nitrogênio pelo animal na fermentação ruminal (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2001; STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004a; ÍTAVO et al., 2011; HEIMBACH et al., 2014).

De acordo com MAKKAR (2005), a técnica de produção de gás *in vitro* tem sido considerada como método aceitável para avaliar os efeitos de fitoquímicos na fermentação microbiana do rúmen. GROOT et al. (1996) mencionaram que diversos modelos não-lineares, com pressuposições e tratamentos distintos, estão disponíveis para ajuste das curvas de

produção cumulativa de gases *in vitro* para a determinação dos parâmetros de degradação ou o conhecimento da cinética de fermentação.

Desta forma, objetivou-se avaliar a inclusão de solução de extrato de própolis, em diferentes diluições e em doses crescentes, na dieta para ruminantes por meio da degradação em líquido ruminal, da produção cumulativa de gases *in vitro* e da cinética da produção de gases ajustada por dois modelos não-lineares: Exponencial (ØRSKOV & McDONALD, 1979) e Logístico Bicompartimental (PELL & SCHOFIELD, 1993).

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) e no Laboratório de Biotecnologia aplicada à Nutrição Animal da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), em Campo Grande - MS.

A própolis bruta foi coletada das colmeias de abelha *Apis mellifera*, instaladas em apiário na Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, situada no município de Terenos/MS, 20°26'34.31''S 54°50'27.86''O, com 530,7 m de altitude. Para produção da própolis foram colocadas telas de nylon entre a melgueira e a tampa. Após 45 dias as telas foram removidas, embaladas e transportadas até o laboratório de Apicultura da FAMEZ/UFMS, em Campo Grande, MS. A própolis foi proveniente da florada de plantas apícolas da região: *Luehea* sp. (açoita-cavalo), *Piptadenia falcata* (angico-do-cerrado), *Tabebuia* spp. (ipês), *Tabebuia caraíba* (para-tudo), predominando a *Vernonia* spp. (assa-peixes) e a *Cecropia pachystachya* (embaúba).

Para obtenção do extrato da própolis, foram utilizadas 35 g da própolis bruta macerada em 65 mL de álcool de cereais (álcool etílico hidratado de cereais - 95°GL NBR 5991), agitada diariamente, durante 45 dias, e posteriormente filtrada em papel de filtro,

obtendo-se uma solução estoque de extrato de própolis, que foi armazenada em frascos âmbar, e mantida em temperatura ambiente. Foram analisados os parâmetros físico-químicos (cera, resíduo seco, fenóis totais e flavonoides totais) adotados pela legislação brasileira vigente (BRASIL, 2001), segundo a metodologia descrita por FUNARI & FERRO (2006).

Foram adicionados níveis crescentes de solução de extrato de própolis em uma dieta contendo concentrado à base de milho, farelo de soja e núcleo mineral e feno de capim-Tifton, na proporção volumoso:concentrado de 40:60, com base na matéria seca.

Utilizou-se extrato de própolis em diferentes diluições:

- (1) Controle negativo (0% de extrato de própolis a 35% e 100% de álcool de cereais);
- (2) Extrato 50% (50% de extrato de própolis a 35% e 50% água);
- (3) Extrato 70% (70% de extrato de própolis a 35% e 30% de água);
- (4) Extrato 100% (100% de extrato de própolis a 35%);

Cada diluição foi adicionada em cinco doses: 4; 8; 12; 16 e 20 mL/kg de MS de ração, ao concentrado, e em seguida misturado ao feno para compor a ração total (Tabela 1).

As amostras dos alimentos foram pré-secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C por 72 horas e trituradas em moinho com peneira dotada de crivos de 1 mm. Para a composição química, foram determinados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), pelos métodos 930.15, 932.05, 976.05 e 920,39 (AOAC, 2000), respectivamente, e da fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), o método utilizado foi segundo GOERING & VAN SOEST (1970), sem o uso de sulfito e amilase termoestável. Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram obtidos segundo equação proposta por SNIFFEN et al. (1992), onde $CNF = CHOT - FDN$ (Tabela 2).

Para produção cumulativa de gases *in vitro*, foram pesados 0,5 g de amostra, em triplicata, incubados com saliva artificial (MARTEN & BARNES, 1980) e inóculo proveniente de duas vacas mantidas em pastagens recebendo suplementação proteica-energética, sendo fistuladas no rúmen de acordo com CAMPOS et al. (2000). Durante 96 horas, avaliou-se a cinética da digestão por intermédio da produção de gás no processo fermentativo de cada alimento através de sistema computadorizado sem fio, dotado de transdutor de pressão, com comunicação feita por rádio frequência (ANKOM[®] RF – *Gas production system*). Os dados de pressão, em psi, foram coletados a cada 10 minutos, sendo transformados para mL de gás/100 mg de matéria seca da amostra fermentada.

Os valores de produção cumulativa de gases, correspondentes às diferentes frações analisadas, foram obtidos segundo os modelos não-lineares:

(1) Logístico Bicompartimental (PELL & SCHOFIELD, 1993)

$$y = A/\{1+\exp[2+4*B*(C-t)]\}+D/\{1+\exp[2+4*E*(C-t)]\},$$

Em que: y= Volume total de gás no tempo t (extensão da degradação); A = volume de gás produzido (mL) proveniente da fração de degradação rápida (açúcares solúveis, amido, aminoácidos solúveis e nitrogênio não proteico); B = taxa de degradação da fração de digestão rápida; C = tempo de colonização das bactérias (h) e início da fermentação (*log time*); D= volume de gás produzido (mL) provenientes das frações de degradação lenta (celulose, hemicelulose e proteína verdadeira); E= taxa de degradação da fração de digestão lenta e,

(2) Exponencial (ØRSKOV & McDONALD, 1979)

$$y = a+b*(1- \exp^{-kt}),$$

Em que: y= Volume total de gás no tempo t (extensão da degradação); a = volume de gás produzido (mL) proveniente da fração de degradação rápida (açúcares solúveis, amido, aminoácidos solúveis e nitrogênio não proteico); b = volume de gás produzido (mL)

proveniente da fração potencialmente degradável (fração fibrosa e proteínas); k = taxa de degradação da fração b ; t = tempo de incubação.

Os parâmetros do modelo foram estimados pelo método iterativo de Gauss-Newton inserido no procedimento Equações Não-Lineares do Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, UFV, versão 9.1, 2007). As estimativas dos parâmetros foram submetidas à análise de variância e regressão em função as médias obtidas para cada variável em função do processamento e do nível de inclusão, sendo considerada significativa a 10% de probabilidade.

O delineamento estatístico utilizado foi inteiramente casualizado em um esquema fatorial 4×5 , com quatro diluições (0, 50, 70 e 100% de extrato de própolis) e cinco doses (4; 8; 12; 16 e 20 mL/kg de MS da ração) em 96 horas de fermentação *in vitro*, com três repetições por diluição e dose, no seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + C_j + TC_k + \epsilon_{ijkl} \text{ em que:}$$

μ = Média geral; T_i = Efeito de tratamento, $i = 1, \dots, 4$; C_j = Efeito de dose, $j = 1, \dots, 5$; TC_k = Efeito da interação processamento \times dose e ϵ_{ijkl} = Erro experimental associado a cada observação Y .

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato alcoólico de própolis, na proporção de 35 g de própolis bruta por 65 mL de álcool de cereais, apresentou 29,90 mg/mL de cera, 151,28 mg/mL de resíduo seco, 27,65 mg/mL de fenóis totais e 13,98 mg/mL de flavonoides totais, e portanto classificado como dentro dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, onde o teor de flavonoides da própolis é de 0,25% - mínimo (2,5 mg/mL) e de compostos fenólicos 0,50% - mínimo (5,0 mg/mL) (BRASIL, 2001).

Houve interação significativa entre diluição e dose. A degradabilidade da MS sem aditivo foi 678,55 g/kg. Houve efeito significativo de tratamento (diluição de extrato de própolis e de dose) sobre a degradabilidade da matéria seca (Tabela 2).

Para o tratamento com álcool puro (controle negativo) houve um efeito exponencial negativo ($y = 678,55 \cdot \text{dose}^{-0,271}$) sobre a degradabilidade da MS (Tabela 2) com mínimo observado de 303,61 g/kg para a dose de 20 mL/kg MS. Isto indica que a inclusão de álcool puro no líquido ruminal, em doses crescentes, irá interferir negativamente na síntese microbiana e na fermentação de substrato pelos microrganismos anaeróbicos presentes no líquido ruminal. Este resultado também refletiu na produção cumulativa de gases *in vitro*, onde o tratamento Álcool puro (controle negativo) apresentou a menor produção cumulativa de gás 6,9 e 7,9 mL/100 mg de MS, respectivamente, para os modelos Bicompartimental e Exponencial (Tabelas 3 e 4).

O Extrato 100% (35 g de própolis bruta e 65 mL de álcool de cereais) apresentou os maiores valores de degradabilidade *in vitro* (Tabela 2), com máximo estimado em 18,93 mL/kg MS. Tal fato sugere que há efeito dos compostos presentes no extrato de própolis, que estimularam a degradação da matéria seca da ração no líquido ruminal, provavelmente pela seleção e estímulo de crescimento de algumas bactérias ruminais, principalmente Gram-negativas.

A ação antimicrobiana da própolis sobre o crescimento, potencial de membrana e a motilidade das bactérias foi estudado por MIRZOEVA et al. (1997), que identificaram efeito da própolis sobre a permeabilidade iônica da membrana interna da bactéria e mostrou que a própolis causou a dissipação do potencial da membrana, prejudicando a síntese de ATP, o transporte de íons e a motilidade da bactéria Gram-positiva. A própolis possui uma atividade antibacteriana maior contra as bactérias Gram-positivas e limitada contra Gram-negativas (BANKOVA et al., 1999; MARCUCCI et al., 2001; PACKER & LUZ, 2007).

As bactérias Gram-negativas possuem uma parede celular menos rígida do que as bactérias Gram-positivas, no entanto, quimicamente mais complexa, apresentando lipopolissacarídeo e um teor lipídico maior, o que pode explicar essa maior resistência ao extrato de própolis (VARGAS et al., 2004).

Os flavonoides presentes no extrato de própolis atuam contra microrganismos através da inibição da função da membrana citoplasmática, inibição da síntese da célula bacteriana ou inibição da síntese de ácido nucleico (CUSHNIE & LAMB, 2005). Tal fato pode estar associado aos maiores resultados de degradabilidade dos tratamentos com extrato de própolis, em relação ao controle negativo, que contém álcool puro com ação bactericida total.

O Extrato 70% apresentou estimativa de degradabilidade mínima com a adição de 6,35 mL/kg MS e o tratamento Extrato-50% apresentou a estimativa de mínima degradabilidade de 7,65 mL/kg MS. Estas estimativas são muito próximas e indicam, mesmo com a diluição em água (30% ou 50% de água), que o extrato de própolis ainda apresenta algum efeito sobre a fermentação microbiana, também observado para as estimativas da produção de gás (Tabelas 3 e 4). A presença de flavonoides no extrato de própolis (13,98 mg/mL) foi capaz de influenciar a fermentação no líquido ruminal, provavelmente pela seleção de bactérias.

A diluição em água da solução etanólica de própolis reduziu a ação bacteriostática do extrato de própolis, provavelmente pela menor inclusão dos compostos ativos na ração. A composição química da própolis inclui flavonoides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), que são compostos polifenólicos naturais largamente distribuídos nos vegetais superiores. Também apresenta ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (como os ácidos cafeico e clorogênico), esteroides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos e vários outros compostos em

pequenas quantidades (BANKOVA et al., 2000; PACKER & LUZ, 2007; LUSTOSA et al., 2008), considerados na análise como fenóis totais (27,65 mg/mL).

PARK et al. (1998) testando o uso de água e concentrações de etanol, verificaram que a maioria dos flavonoides foi extraída nas concentrações alcoólicas entre 60 e 80%, apresentando inibição satisfatória do crescimento microbiano, sendo que os extratos etanólicos a 70 e 80% apresentaram grande atividade antioxidante, similar ao tratamento Extrato 100% (35 g de própolis bruta e 65 mL de álcool de cereais), com resultados favoráveis sobre a degradabilidade ruminal e produção de gás *in vitro* (Tabelas 2 e 3).

OLIVEIRA et al. (2004) estudaram o efeito da monensina e do extrato de própolis sobre a degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio, utilizando líquido ruminal de bovino mantido em pastagem de *Brachiaria* spp., e verificaram que a monensina e a própolis foram eficientes em reduzir a produção de amônia de fontes de proteína de maior degradabilidade, sendo a própolis mais eficiente que a monensina, isto porque reduz a atividade da desaminação (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2001), o que favoreceria o aumento na síntese e eficiência microbiana, uma vez que as bactérias ruminais utilizam melhor as fontes de nitrogênio presentes na dieta. Tais relatos corroboram com os resultados de degradabilidade *in vitro* (Tabela 2) maiores para dietas com inclusão de extrato de própolis.

Houve efeito de diluição e dose sobre a produção cumulativa de gases, estimada pelo modelo Logístico Bicompartimental (PELL & SCHOFIELD, 1993) e pelo modelo Exponencial (ØRSKOV & McDONALD, 1979) (Tabelas 3 e 4). Observa-se para o tratamento Álcool puro (controle negativo) um efeito exponencial negativo, onde a adição de álcool à dieta reduziu a produção de gases, por meio, provavelmente, da mortalidade de microrganismos no líquido ruminal (efeito bactericida).

O potencial de redução estimado pelo modelo proposto por PELL & SCHOFIELD, (1993) foi de -0,32 mL de gás produzido para cada mL de álcool adicional. Da mesma forma, as estimativas obtidas por meio do modelo de ØRSKOV & McDONALD (1979), apresentaram o mesmo comportamento exponencial negativo para o tratamento Álcool puro (controle negativo), com o mesmo potencial de redução, -0,32 mL de gás produzido para cada mL de álcool adicional.

Houve efeito de dose para os tratamentos com extrato de própolis (Tabela 3). Observa-se que os tratamentos com adição de extrato de própolis apresentaram comportamento quadrático em função da dose aplicada, com exceção do tratamento Extrato 50% com estimativas obtidas pelo Modelo Exponencial: $Y_{\text{exponencial}} = 14,4549 + 0,0576799 \cdot \text{dose}$ ($R^2=0,94$), que apresentou aumento exponencial na produção cumulativa de gases *in vitro*. Tal fato sugere que houve maximização do efeito na produção de gás *in vitro* com o aumento da dose, uma vez que as maiores doses forneceriam maiores quantidades de flavonoides e fenóis totais.

Utilizando-se o modelo proposto por PELL & SCHOFIELD (1993), o tratamento Extrato 70% apresentou máxima estimativa de produção cumulativa de gases *in vitro* com 11,43 mL, a partir da derivada da equação ajustada em função da dose e do tempo de inibição ($Y = 13,2401 + 1,90770 \cdot \text{dose} - 0,0834357 \cdot \text{dose}^2$ ($R^2=0,92$)). O tratamento Extrato 100% apresentou máxima estimativa com 13,10 mL de produto adicionado à dieta, utilizando-se a equação $Y = 16,5623 + 3,69375 \cdot \text{dose} - 0,140931 \cdot \text{dose}^2$ ($R^2=0,92$). Da mesma forma, as estimativas obtidas por meio do modelo de ØRSKOV & McDONALD (1979), foram 12,07 mL e 12,60 mL de extrato, respectivamente para os tratamentos Extrato 100% e Extrato 70% (Tabelas 3 e 4).

ÍTAVO et al. (2011) sugerem a utilização de 15 ml de extrato da própolis marrom/kg de MS para melhorar a conversão alimentar em substituição a monensina sódica de ovinos

confinados. Neste sentido, os resultados obtidos neste ensaio demonstram a importância de análises *in vitro*, uma vez que se verificou ação com 13 mL/kg MS, o que significa economia em termos de administração em larga escala aos animais.

Tais resultados indicam que a inclusão de própolis proporciona melhoria na degradação da MS (Tabela 2), provavelmente por meio da seleção bacteriana (ação bacteriostática), também observada pela produção cumulativa de gases (Tabelas 3 e 4). Entretanto, o potencial de acréscimo na degradação e conseqüentemente, na produção de gases é limitado como demonstrado pelo comportamento quadrático das estimativas. Provavelmente, devido aos fatores associados ao ambiente ruminal, sendo a taxa de passagem e a taxa de diluição ausentes em ambiente *in vitro*, o que pode estar impedindo o máximo potencial de ação da solução de própolis como aditivo, devido a presença de álcool em sua composição.

O tratamento Extrato 100% apresentou as maiores estimativas de produção de gases, com valores acima de 30 mL de gás/100mg de MS fermentada (Tabelas 3 e 4). Esses resultados são superiores aos resultados apresentados por HEIMBACH et al. (2014), que estudaram a adição de resíduo da extração de própolis marrom na dieta para ruminantes e encontraram maiores estimativas de produção de gases *in vitro* (18,18 mL) com a adição de 10 g/kg de MS incubada em líquido ruminal de ovinos. Já para o líquido ruminal de bovinos, os maiores resultados de produção de gases foram observados com a adição de 5 g/kg de MS (16,89 mL). Estes autores também utilizaram feno de capim-Tifton e concentrado a base de milho e farelo de soja, porém, numa proporção volumoso: concentrado igual a 50:50.

A dose de 20 mL de Extrato 70% apresentou média de 18,26 mL de gás/100 mg de MS (Tabelas 3 e 4), semelhantes aos (18,78 mL gás/100 mg MS) apresentados por HEIMBACH et al. (2014). Provavelmente, as diferenças entre as estimativas de produção de gases encontradas nos tratamentos Extrato 100% e Extrato 70% em comparação com os

resultados de HEIMBACH et al. (2014) estejam relacionados a concentração de fenóis e flavonoides totais, uma vez que os autores avaliaram o resíduo da extração de própolis com concentração de fenóis totais de 0,24 mg/g de resíduo seco e flavonoides totais de 0,35 mg/g de resíduo seco, contrariamente ao extrato de própolis puro utilizado (Extrato 100%) que apresentou 151,28 mg/mL de resíduo seco, 27,65 mg/mL de fenóis e 13,98 mg/mL de flavonoides totais. As médias observadas para as diferentes doses de Extrato 100% foram superiores aos observados por HEIMBACH et al. (2014) e, portanto, poderiam apresentar maiores efeitos sobre as bactérias presentes no líquido ruminal e, conseqüentemente, maiores resultados de degradabilidade e produção de gás *in vitro*.

CONCLUSÃO

O extrato de própolis marrom (35:65), sem diluição em água, apresenta os melhores resultados de degradabilidade e produção cumulativa de gases *in vitro*.

Recomenda-se a adição máxima de 13 mL de extrato de própolis marrom/kg de MS da dieta (35 g/100 mL de própolis e 65 mL/100 mL) para obtenção de resultados favoráveis para degradação e fermentação, atuando como aditivo para rações de ruminantes.

REFERÊNCIAS

AOAC. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International**. Gaithersburg: AOAC, 2000.

BANKOVA, V. et al. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. **Fitoterapia**, v.70, n.2, p.190-193, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874198001317>>. Acesso em: 12 ago. 2014. doi: 10.1016/S0378-8741(98)00131-7.

BANKOVA, V.S. et al. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, n.1, p.3-15, 2000. Disponível em: <http://www.apidologie.org/index.php?option=com_article&access=standard&Itemid=129&url=/articles/apido/pdf/2000/01/M0105.pdf>. Acesso em: 3 mai. 2014. doi: 10.1051/apido:2000102.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Instrução Normativa n.3, de 19 de Janeiro de 2001. **Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**, 2001. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798>>. Acesso em: 07 de novembro 2013.

CAMPOS, F.P. et al. Avaliação do sistema de monitoramento computadorizado de digestão *in vitro*. 3. Desaparecimento da matéria seca e/ou FDN pela produção de gás. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 2, p. 537-544, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v29n2/5793.pdf>>. Acesso em: 18 jun. 2014.

CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n.1, p.243-248, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037887410500293X>>. Acesso em: 29 mar. 2014. doi: 10.1016/j.jep.2005.04.014.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v.26, n.1, p.171-178, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v26n1/28867.pdf>>. Acesso em: 12 de ago. 2013.

GHISALBERTI, E.L. Propolis: a review. **Bee World**, v.60, p.59-84, 1979.

GOERING, H.K.; VAN SOEST, P.J. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). **US Department of Agriculture Handbook**, 1970.

GROOT, J.C.J. et al. Multiphasic analysis of gas production kinetics for *in vitro* fermentation of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.64, p.77-89, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840196010127>>. Acesso em: 28 nov. 2013. doi: 10.1016/S0377-8401(96)01012-7.

HEIMBACH, N.S. et al. Resíduo da extração de própolis marrom na dieta de ruminantes: digestibilidade e produção de gás *in vitro*. **Archivos de Zootecnia**. v.63, n.242, p.259-267. 2014. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=49530665004>>. Acesso em: 1 set. 2014.

ÍTAVO, C.C.B.F. et al. Addition of própolis or monensin in the diet: Behavior and productivity of lambs in feedlot. **Animal Feed Science and Technology**, v.165, p.161-166, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840111000812>>. Acesso em: 27 mai. 2013. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.02.020.

LUSTOSA, S.R.; et al. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.447-454, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n3/a20v18n3.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2013.

MAKKAR, H.P.S. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. **Animal Feed Science and Technology**, v.123, p.291-302, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0377840105002610>>. Acesso em: 12 mai. 2014. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2005.06.003.

MARCUCCI, M.C. et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v 74, n 2, p.105-112, 2001. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874100003263>>. Acesso em: 12 jul. 2014. doi: 10.1016/S0378-8741(00)00326-3.

MARTEN, G.C.; BARNES, R.F. Prediction of energy digestibility of forages with *in vitro* rumen fermentation and fungal enzyme systems. **Standardization of analytical methodology for feeds**, p. 61-71, 1980.

MELLO, R. et al. Modelos para ajuste da produção de gases em silagens de girassol e milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, n.2, p.261-269, 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.org/pdf/pab/v43n2/a16v43n2.pdf>>. Acesso em: 24 set. 2013.

MIRZOEVA, O. K. et al. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potencial and motility of bacteria. **Microbiology Research**, v.152, n.3, p.239-246, 1997. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501397800341>>. Acesso em: 30 jul. 2013. doi: 10.1016/S0944-5013(97)80034-1.

OLIVEIRA, J.S. et al. Efeito da monensina e extrato de própolis sobre a produção de amônia e degradabilidade *in vitro* da proteína bruta de diferentes fontes de nitrogênio. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.504-510, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v33n2/21265.pdf>>. Acesso em: 6 mai. 2014.

ØRSKOV, E. R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, v.92, p.449-503, 1979. Disponível em: <<http://journals.cambridge.org/action/displayAbstract?fromPage=online&aid=4777356&fileId=S0021859600063048>>. Acesso em: 1 jun. 2014. doi: 10.1017/S0021859600063048.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107,

2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v17n1/a19v17n1>>. Acesso em: 19 jan. 2014.

PARK, Y.K. et al. Classificação das própolis brasileiras a partir de suas características físico-químicas e propriedades biológicas. **Mensagem doce**, v.58, n.9, p.3-7, 2000. Disponível em: <<http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/artigo.htm>>. Acesso em: 11 mai. 2014.

PARK, Y.K.; et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.3, p. 313-318, 1998. Disponível em: <http://www.educadores.iaadia.pr.gov.br/arquivos/File/2010/veiculos_de_comunicacao/CTA/VOL18N3/CTA18N3_10.PDF>. Acesso em: 7 abr. 2014.

PELL, A.N., SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1063-1073, 1993. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030293774354>>. Acesso em: 6 mai. 2014. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(93)77435-4.

PRADO, O.P.P. et al. Adição de própolis ou monensina sódica sobre digestibilidade *in vitro* da matéria seca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.4, p.1023-1032, 2010. Disponível em: <<http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/viewArticle/1765>>. Acesso em: 5 fev. 2014.

SNIFFEN, C. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. **Journal of Animal Science**, v. 70, n. 11, p. 3562-3577, 1992. Disponível em: <<http://www.journalofanimalscience.org/content/70/11/3562.short>>. Acesso em: 12 jul. 2013.

STRADIOTTI JÚNIOR, D. et al. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n.4, p.1086-1092, 2004b. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982004000400029>. Acesso em: 26 jun. 2014.

STRADIOTTI JÚNIOR, D. et al. Ação da própolis sobre microorganismos ruminais e sobre alguns parâmetros de fermentação no rúmen. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 38, 2001, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Sociedade Brasileira de Zootecnia, p.942-944, 2001.

STRADIOTTI JÚNIOR, D. et al. Ação do Extrato de Própolis sobre a Fermentação *in vitro* de Diferentes Alimentos pela Técnica de Produção de Gases. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.4, p.1093-1099, 2004a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982004000400030>.

Acesso em: 11 mai. 2013.

VARGAS, A.C. et al. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-163, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v34n1/a24v34n1.pdf>. Acesso em: 11 mai. 2013.> Acesso em: 11 mai. 2013.

Tabela 1 - Proporção de ingredientes e composição química da ração

Ingredientes	
Milho Moído (g/kg)	435,00
Farelo de Soja (g/kg)	138,00
Núcleo Mineral (g/kg)	17,00
Ureia (g/kg)	10,00
Feno de Tifton (g/kg)	400,00
Nutrientes	
Matéria seca (g/kg)	915,29
Matéria orgânica (g/kg MS)	921,20
Proteína bruta (g/kg MS)	180,54
Extrato etéreo (g/kg MS)	27,78
Fibra em detergente neutro (g/kg MS)	429,99
Fibra em detergente ácido (g/kg MS)	202,27
Carboidratos não fibrosos (g/kg MS)	28,30
Energia Metabolizável (Mcal/kg MS)	1,92
Estimativa de Energia Metabolizável: NDT x 0,82	

Tabela 2 - Degradabilidade da matéria seca (g/kg MS) em função das diluições e doses utilizadas em 96 horas de fermentação *in vitro*

Doses (mL/kg MS)	Diluições				EPM	P
	¹ Controle Negativo (Álcool puro)	² Extrato- 50%	³ Extrato- 70%	⁴ Extrato- 100%		
0	678,55	678,55	678,55	678,55	1,619	0,211
4	466,94	522,20	592,87	686,23	2,629	0,155
8	381,09b	546,17ab	638,76ab	782,48a	4,424	0,087
12	347,06c	654,04b	677,09ab	927,22a	5,716	0,010
16	306,35c	720,88b	723,74b	806,58a	5,733	0,049
20	303,61c	724,67b	794,07ab	872,81a	6,072	0,007
EPM	2,130	1,123	0,975	1,774		
P	0,029	0,015	0,050	0,040		

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,10)

$$^1 y = 668,55 \cdot dose^{-0,271} \quad (R^2 = 0,98)$$

$$^2 y = 653,067 - 18,7350 \cdot dose + 1,22517 \cdot dose^2 \quad (R^2 = 0,90)$$

$$^3 y = 667,682 - 11,8769 \cdot dose + 0,934635 \cdot dose^2 \quad (R^2 = 0,90)$$

$$^4 y = 664,197 + 21,2811 \cdot dose - 0,561958 \cdot dose^2 \quad (R^2 = 0,76)$$

Controle negativo (0% de extrato de própolis 35% e 100% de álcool de cereais);

Extrato 50% (50% de extrato de própolis 35% e 50% água);

Extrato 70% (70% de extrato de própolis 35% e 30% de água);

Extrato 100% (100% de extrato de própolis 35%);

Tabela 3 - Estimativas da produção cumulativa de gases (mL/100 mg MS) pelo Modelo Logístico-Bicompartmental, em função das diluições e das doses adicionadas (0, 4, 8, 12, 16 e 20 mL/kg MS) em 96 horas de fermentação *in vitro*

Doses mL/kg MS	Diluições [#]				EPM	P
	¹ Controle Negativo (Álcool puro)	² Extrato 50%	³ Extrato 70%	⁴ Extrato 100%		
Modelo Logístico-Bicompartmental						
0	14,26	14,26	14,26	14,26	0,124	NS
4	10,66d	14,01c	16,19b	35,13a	0,369	0,001
8	9,52d	13,17c	23,76b	35,60a	0,381	0,001
12	9,59d	13,22c	27,07b	39,92a	0,322	0,001
16	7,66d	15,81c	20,43b	36,79a	0,337	0,001
20	6,90d	16,19c	18,26b	36,09a	0,315	0,001
EPM	0,043	0,023	0,082	0,176		
P	0,001	0,001	0,001	0,001		

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,10)

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo (P>0,05);

¹Controle negativo (0% de extrato de própolis 35% e 100% de álcool de cereais);

²Extrato 50% (50% de extrato de própolis 35% e 50% água);

³Extrato 70% (70% de extrato de própolis 35% e 30% de água);

⁴Extrato 100% (100% de extrato de própolis 35%);

¹ $Y_{\text{bicompartmental}} = 12,9597 - 0,321742 \cdot \text{dose}$ ($R^2=0,93$); ² $Y_{\text{bicompartmental}} = 14,5422 - 0,29840 \cdot \text{dose} + 0,0199332 \cdot \text{dose}^2$ ($R^2=0,82$); ³ $Y_{\text{bicompartmental}} = 13,2401 + 1,90770 \cdot \text{dose} - 0,0834357 \cdot \text{dose}^2$ ($R^2=0,92$); ⁴ $Y_{\text{bicompartmental}} = 16,5623 + 3,69375 \cdot \text{dose} - 0,140931 \cdot \text{dose}^2$ ($R^2=0,92$)

Tabela 4 - Estimativas da produção cumulativa de gases (mL/100 mg MS) pelo Modelo Exponencial, em função das diluições e das doses adicionadas (0, 4, 8, 12, 16 e 20 mL/kg MS) em 96 horas de fermentação in vitro

Doses mL/kg MS	Diluições [#]				EPM	P
	¹ Controle Negativo (Álcool puro)	² Extrato 50%	³ Extrato 70%	⁴ Extrato 100%		
	Modelo Exponencial					
0	14,24	14,24	14,24	14,24	0,615	NS
4	10,85c	15,20b	16,85b	37,16a	0,0322	0,001
8	9,56d	15,17c	24,19b	38,12a	0,303	0,001
12	8,47d	15,27c	22,78b	36,29a	0,321	0,001
16	8,63d	14,48c	19,12b	37,56a	0,309	0,001
20	7,86d	16,05c	20,95b	31,93a	0,302	0,001
EPM	0,365	0,324	0,322	0,386		
P	0,001	0,002	0,001	0,001		

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na mesma linha, diferem entre si pelo teste Tukey (P<0,10)

EPM = Erro padrão da média; NS = não significativo (P>0,05);

¹Controle negativo (0% de extrato de própolis 35% e 100% de álcool de cereais);

²Extrato 50% (50% de extrato de própolis 35% e 50% água);

³Extrato 70% (70% de extrato de própolis 35% e 30% de água);

⁴Extrato 100% (100% de extrato de própolis 35%);

¹Y_{exponencial} = 13,2719 - 0,317609.dose (R²=0.85); ²Y_{exponencial} = 14,4549 + 0,0576799.dose (R²=0.94); ³Y_{exponencial} = 14,1354 + 1,33265.dose - 0,05290.dose² (R²=0.78); ⁴Y_{exponencial} = 16,2216 + 4,07810.dose - 0,16892.dose² (R²=0.88);

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade antimicrobiana da própolis é comprovada, no entanto, há necessidade de se conhecer a flora apícola que deu origem a própolis, bem como o teor e a caracterização do perfil dos compostos químicos.

São necessários estudos para uma padronização dos extratos e das concentrações a serem utilizadas, para rotulagem dos extratos em função dos compostos ativos.

Deve ser estabelecido um padrão da metodologia para verificar a atividade inibitória mínima da própolis frente aos microrganismos, para permitir a comparação de resultados e definir o uso da mesma.

É importante que sejam desenvolvidos trabalhos relacionados à produção da própolis e sua utilização como aditivo e antimicrobiano.

Estudos sobre forma e nível de inclusão na dieta de ruminantes devem ser realizados para definição de teores mínimos de fornecimento de flavonoides e fenóis/kg de matéria seca da dieta.

Apesar das propriedades biológicas da própolis já estudadas em outras regiões do Brasil e do mundo, no Estado de Mato Grosso do Sul existem poucos trabalhos que se referem a composição química e a ação microbiológica da própolis.

Dessa forma, trabalhos de análise da composição química da própolis são de grande relevância para que outras pesquisas sejam desenvolvidas no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.