

**INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO  
SUDESTE DE MINAS GERAIS – CAMPUS RIO POMBA**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO ANIMAL**

**ROBERTO JUNIOR TEIXEIRA NASCIMENTO**

**RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS EM DIETAS  
DE BOVINOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE PROTEÍNA**

**RIO POMBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019**

**ROBERTO JUNIOR TEIXEIRA NASCIMENTO**

**RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS EM DIETAS  
DE BOVINOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE PROTEÍNA**

**RIO POMBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019**

**ROBERTO JUNIOR TEIXEIRA NASCIMENTO**

**RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS EM DIETAS  
DE BOVINOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE PROTEÍNA**

Dissertação apresentada ao Campus Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a conclusão do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em “Mestrado Profissional em Nutrição e Produção Animal” para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Rafael Monteiro Araújo Teixeira

Coorientador: Thierry Ribeiro Tomich

RIO POMBA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

**Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca Jofre Moreira – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais / Campus Rio Pomba**  
**Bibliotecária: Ana Carolina Souza Dutra CRB 6 / 2977**

N244r

Nascimento, Roberto Júnior Teixeira.

Resíduo da produção de extrato de própolis em dietas de bovinos com níveis crescentes de proteína./ Roberto Júnior Teixeira Nascimento. – Rio Pomba, 2019.  
v, 29f.

Orientador: Prof. Rafael Monteiro Araújo Teixeira.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Nutrição e Produção Animal - Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais - Campus Rio Pomba.

1. Bovino - Nutrição. 2. Aditivo. 3. Nitrogênio Amoniacal. I. Teixeira, Rafael Monteiro Araújo. II. Título.

CDD: 636.084

**ROBERTO JUNIOR TEIXEIRA NASCIMENTO**

**RESÍDUO DA PRODUÇÃO DE EXTRATO DE PRÓPOLIS EM DIETAS  
DE BOVINOS COM NÍVEIS CRESCENTES DE PROTEÍNA**

Dissertação apresentada ao Campus Rio Pomba, do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia Sudeste de Minas Gerais, como requisito parcial para a conclusão do curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em “Mestrado Profissional em Nutrição e Produção Animal” para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA: 08 de fevereiro de 2019.

---

Thierry Ribeiro Tomich  
Coorientador

---

Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

---

Arnaldo Prata Neiva Junior

---

Edilson Rezende Cappelle

---

Rafael Monteiro Araújo Teixeira  
Orientador

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela oportunidade e vitória depois de tantas dificuldades.

A todos os professores que se dedicaram a criação do programa de pós-graduação Mestrado Profissional em Nutrição e Produção Animal.

Ao professor Rafael Monteiro Araújo Teixeira por ter me orientado e apoiado durante toda trajetória, me motivando e advertindo de forma criteriosa e objetiva.

Ao professor pesquisador Thierry Ribeiro Tomich por ter me acolhido como coorientado e se dedicado tanto para me auxiliar no desenvolvimento do projeto.

À Tânia Dayana do Carmo por todo apoio dado durante o experimento, pela dedicação de todo seu tempo e acolhimento mesmo diante de toda demanda de seu projeto.

A todos colegas que se tornaram grandes amigos.

Aos meus pais José Roberto e Fátima pelo apoio, carinho e compreensão que sem eles nada seria possível.

A minha tia Terezinha pelo incentivo, que sempre me motivou a seguir em frente com os estudos auxiliando a vencer todos os obstáculos.

À minha namorada Joselaine, companheira em todos os momentos que participou de todas as dificuldades. Obrigado por estar sempre ao meu lado.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
RESUMO.....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE TABELAS .....	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 OBJETIVOS .....	3
2.1 Objetivo geral .....	3
2.2 Objetivos específicos .....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	4
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	10
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
6 CONCLUSÃO.....	21
REFERÊNCIAS.....	22
ANEXOS .....	28

## RESUMO

Nascimento, R. J. T., Mestrado Profissional em Nutrição e Produção Animal, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais, fevereiro de 2019. **Resíduo da produção de extrato de própolis em dietas de bovinos com níveis crescentes de proteína.** Orientador: Rafael Monteiro Araújo Teixeira. Co-Orientador: Thierry Ribeiro Tomich.

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo que o coloca entre os maiores produtores de carne e leite. A produção tem aumentado nos últimos anos pela expansão e intensificação da produção, aliadas aos avanços tecnológicos e nutricionais. A manipulação da fermentação ruminal é uma técnica viável para aumentar o aporte de energia para o animal e reduzir a emissão de metano entérico ( $\text{CH}_4$ ) aliando maior conversão alimentar e redução de gases de efeito estufa pela pecuária. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar o efeito do resíduo da extração do extrato de própolis sobre a cinética ruminal de produção de gases avaliando ácidos graxos voláteis (AGV's), produção de  $\text{CH}_4$ , degradação da dieta, pH e nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) *in vitro* em dietas com níveis crescentes de proteína. As dietas foram compostas de silagem de milho (testemunha), 25% concentrado + 75% silagem, 50% concentrado + 50% silagem e 75% concentrados + 25% silagem. Todas as dietas foram incubadas em inóculos provenientes de vacas recebendo ou não adição de resíduo de própolis. Foram utilizadas três vacas fistuladas no rúmen, mantidas em períodos experimentais de 14 dias, recebendo ou não resíduo. A cada período experimental uma vaca recebeu, via fístula, doses de 100g de resíduo para posterior coleta de inóculos para incubação e análise pela técnica *in vitro* de produção de gases. A adição de resíduo não alterou a produção do volume total de gases ( $V_t$ ) e produção de gases proveniente de carboidratos não fibrosos ( $V_f2$ ), mas aumentou ( $p < 0,05$ ) a produção de produção de gases pela fermentação de carboidratos fibrosos ( $V_f1$ ). O resíduo se mostrou eficaz em reduzir a produção de  $\text{CH}_4$  sem diminuir a degradação da matéria seca e mantendo a produção total de gases. Houve redução da relação acetato:propionato que possivelmente colaborou com a menor produção de  $\text{CH}_4$ , devido à menor produção de  $\text{H}_2$ . A presença do resíduo não afetou o pH e a produção  $\text{N-NH}_3$ . Os resultados mostraram que o resíduo do extrato de própolis foi capaz de manipular o ambiente ruminal alterando a produção de gases ( $V_f1$ ),  $\text{CH}_4$  e a relação acetato:propionato, indicando maior aporte de energia e conversão alimentar. Nas condições analisadas, o resíduo de própolis apresentou potencial para ser utilizado como aditivo para bovinos viabilizando estudos para validar tais resultados e avaliação *in vivo*.

**Palavras-chave:** Aditivo, Metano, Nutrição, In Vitro, Nitrogênio amoniacal, pH.



## ABSTRACT

Nascimento, R. J. T., Professional Master in Animal Nutrition and Production, Federal Institute of Education, Science and Technology of the Southeast of Minas Gerais, February 2019. **RESIDUE FROM THE PRODUCTION OF PROPOLIS EXTRACT IN BOVINE DIETS WITH INCREASING PROTEIN LEVELS**. Advisor: Rafael Monteiro Araújo Teixeira. Co-Advisor: Thierry Ribeiro Tomich.

Brazil has the largest commercial cattle herd in the world that places it among the largest producers of meat and milk. Production has increased in recent years by the expansion and intensification of production combined with technological and nutritional advances. The manipulation of ruminal fermentation is a viable technique to increase the energy supply to the animal and reduce the emission of enteric methane (CH<sub>4</sub>), allowing greater feed conversion and reduction of greenhouse gases by livestock. The objective in this work was to evaluate the effect of the extraction of the propolis extract on the ruminal kinetics of gas production by evaluating volatile fatty acids, CH<sub>4</sub> production, dietary degradation, pH and ammoniacal nitrogen (NH<sub>3</sub>-N) *in vitro* on diets with increasing protein levels. The diets were composed of corn silage (control), 25% concentrated + 75% silage, 50% concentrated + 50% silage and 75% concentrated + 25% silage. All diets were incubated in inoculum from cows receiving or not adding propolis residue. Three rumen fistulated cows were used maintained in experimental periods of 14 days receiving or not residue. At each experimental period, a cow received via fistula doses of 100 g of residue for later collection of inoculums for incubation and analysis by the *in vitro* technique of gas production. The residue addition did not alter the production of the total volume of gases (V<sub>t</sub>) and the gases production from non-fibrous carbohydrates (V<sub>f2</sub>) but increased (p<0.05) the gases production by the fermentation of fibrous carbohydrates (V<sub>f1</sub>). The residue proved effective in reducing CH<sub>4</sub> production without reducing dry matter degradation and maintaining total gas production. There was a reduction of the acetate:propionate ratio that possibly contributed to the lower production of CH<sub>4</sub> due to lower H<sub>2</sub> production. The residue presence did not affect pH and NH<sub>3</sub>-N production. The results showed that the propolis extract residue was able to manipulate the ruminal environment, altering the gas production (V<sub>f1</sub>), CH<sub>4</sub> and the acetate:propionate ratio, indicating a higher energy intake and feed conversion. Under the conditions analyzed, the propolis residue had potential to be used as a feed additive for bovines, allowing studies to validate such results and *in vivo* evaluation.

**Keywords:** Additive, Methane, Nutrition, *In Vitro*, Ammoniacal nitrogen, pH.

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
1 Composição bromatológica do concentrado (farelo de soja e minerais) e silagem de milho que compuseram as dietas utilizadas para incubação <i>in vitro</i> . Sendo as dietas compostas de silagem (grupo controle) e níveis crescentes de concentrado (25, 50 e 75% na MS). .....	11
2 Parâmetros de cinética ruminal <i>in vitro</i> de dietas com níveis crescentes de concentrado a base de farelo de soja com ou sem uso de aditivo de resíduo de extrato de própolis.....	15
3 Concentrações e relação de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), índice de pH e concentração de nitrogênio amoniacal às 24 horas incubação com ou sem uso de aditivo de resíduo de extrato de própolis em dietas com níveis crescentes de concentrado a base de farelo de soja.....	17
4 Produção de metano (CH <sub>4</sub> ) <i>in vitro</i> como percentagem dos gases, como volume por unidade de matéria seca e como volume por unidade de matéria seca digestível incubadas, energia contida no metano emitido, perda de energia pelo metano e produção de metano em função da produção de ácidos graxos voláteis com ou sem uso de aditivo de resíduo de extrato de própolis em dietas com níveis crescentes de concentrado a base de farelo de soja.....	19

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CH <sub>4</sub>	Metano
CNF	Carboidratos não fibrosos
CF	Carboidratos fibrosos
AGV's	Ácidos graxos voláteis
MS	Matéria seca
N-NH <sub>3</sub>	Nitrogênio amoniacal
GEE	Gases de efeito estufa
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
N <sub>2</sub> O	Oxido nitroso
OMS	Organização Mundial da Saúde
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CONAP	Cooperativa Nacional de Apicultura
PB	Proteína Bruta
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FDA	Fibra em Detergente Ácido
EE	Extrato Etéreo
MO	Matéria Orgânica
NDT	Nutrientes Digestíveis Totais
ED	Energia Digestível
CG	Cromatografia em fase gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
V <sub>t</sub>	Volume total de gás
V <sub>f1</sub>	Gases provenientes de carboidratos fibrosos
V <sub>f2</sub>	Gases provenientes de carboidratos não fibrosos
A	Aditivos – resíduo de própolis
FS	Farelo de soja
DMS	Degradação da matéria seca

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca na pecuária em primeiro lugar no *ranking* mundial entre os exportadores de carne e se classifica como sexto maior produtor de leite no mundo (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2017). O setor pecuário exerce papel fundamental para a economia do país, e vem se expandindo nos últimos anos graças à intensificação e adoção de novas técnicas de manejo.

A pecuária é capaz de transformar alimentos de baixa digestibilidade, como a forragem, em alimentos nobres como carne e leite graças à simbiose com os microrganismos ruminais. Desta forma, manipular o ambiente ruminal e acelerar o crescimento bacteriano, afeta diretamente o desempenho dos bovinos. Um dos fatores que reduz o aproveitamento da dieta é a produção de metano ( $\text{CH}_4$ ) durante a fermentação que ocorre no rúmen. O  $\text{CH}_4$ , além de impactar negativamente a produção representando desperdício de energia, contribui com o efeito estufa.

A produção de  $\text{CH}_4$  ocorre constantemente no trato digestivo dos ruminantes eliminando o  $\text{H}_2$  produzido e assim mantendo o padrão fermentativo, porém este processo representa para os animais desperdício de energia na escala de 9,45 kcal/L de metano produzido (BROUWER, 1965; GUAN et al., 2006). Devido ao impacto negativo na eficiência biológica do animal, a emissão de  $\text{CH}_4$  tem sido investigada por diversas pesquisas utilizando aditivos e manipulando a dieta animal.

Para reduzir a produção de  $\text{CH}_4$ , pode-se ajustar a dieta alterando a fonte de carboidrato, aumentando proporção de carboidratos não fibrosos (CNF) em detrimento de carboidratos fibrosos (CF) e, também, manipular a fermentação ruminal com uso de aditivos. Os aditivos mais estudados e comercializados para a manipulação ruminal são os ionóforos, substâncias com efeito antibiótico e coccidiostático, que reduzem seletivamente a população de bactérias Gram-positiva precursoras de  $\text{CH}_4$ . Nos sistemas de produção, principalmente em confinamentos, os ionóforos estão entre os aditivos primários mais utilizados (OLIVEIRA; MILLEN, 2014).

Dentre as características mais desejáveis dos ionóforos nos ruminantes estão: melhorar a conversão alimentar e aporte de energia, aumentar a produção de propionato, reduzir a formação de  $\text{CH}_4$ , aumentar o aproveitamento de nitrogênio ruminal diminuindo a taxa de desaminação e controlar problemas metabólicos como a acidose, timpanismo e coccidiose (NICODEMO, 2001).

No entanto, a utilização de ionóforos na alimentação animal tem sido apontada

como risco à saúde humana devido à possibilidade de resistência de microrganismos a medicamentos usados para tratar doenças em humanos. Ainda não está totalmente elucidada a relação de resistência bacteriana com o uso de ionóforos, como a monensina sódica, mas as barreiras comerciais impulsionam a necessidade de encontrar aditivos alternativos, que contribuam para maior conversão alimentar, reduzam a produção de CH<sub>4</sub> e não ofereçam riscos à saúde humana.

A própolis, produzida por abelhas *Apis mellifera* sp., a partir de exsudatos vegetais, cera, enzimas, pólen entre outros elementos, pode ser uma alternativa principalmente por sua característica antibacteriana (PACKER; LUZ, 2007). As bactérias Gram-positivas são mais sensíveis à ação da própolis em comparação com as Gram-negativas se assemelhando a ação dos ionóforos (REZENDE; PIMENTA; COSTA, 2006). A atuação da própolis como modulador da fermentação ruminal não está totalmente elucidada, porém alguns autores encontraram resultados positivos, como redução da produção de CH<sub>4</sub> (LEOPOLDINO et al., 2007) e a redução da desaminação dos aminoácidos e manutenção da amônia ruminal (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004). Estes autores utilizaram em seus tratamentos extratos alcoólicos de própolis, mas o alto custo inviabilizaria sua utilização como aditivo na alimentação animal, principalmente em dietas de bovinos. Já o resíduo da própolis, gerado após a extração alcoólica, ainda possui princípios ativos (HEIMBACH et al., 2016) e poderia ser uma alternativa viável, sustentável e de baixo custo para ser adicionada em dietas de bovinos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito da adição de resíduo proveniente do extrato de própolis utilizando a técnica *in vitro* de produção de gases em dietas com níveis crescentes de proteína bruta contendo silagem de milho e concentrado à base de farelo de soja.

### **2.2 Objetivos específicos**

Avaliação da cinética de produção de gases analisando produção de gás total e produção proveniente da fermentação de carboidratos fibrosos e não fibrosos;

Avaliação da produção de ácidos graxos voláteis (AGV's), relação acetato:propionato e produção de CH<sub>4</sub>;

Avaliação da degradação da Matéria Seca (MS) *in vitro* para os tratamentos obtida por gravimetria;

Avaliação do pH e do nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O Brasil se destaca na pecuária mundial sendo o segundo maior produtor e primeiro maior exportador de carne e possui o segundo maior rebanho com efetivo de bovinos estimado em 214,899 milhões de cabeça. Na pecuária de leite, com 17,06 milhões de vacas ordenhadas e produção de 33,49 milhões de litros de leite, é o sexto maior produtor (IBGE, 2017).

A demanda impulsionou o crescimento da produção que, em grande parte, está relacionada à maior intensificação do sistema (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO; GLOBAL DAIRY PLATFORM - GDP, 2018). O aumento da produção requer melhor conversão alimentar aproveitando ao máximo os recursos disponíveis que pode ser aumentada pela manipulação do ambiente ruminal. Desta forma, a fermentação ruminal produz gases como o CO<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub> que não podem ser absorvidos e utilizados pelos bovinos e são liberados no meio ambiente gerando perdas energéticas. O CH<sub>4</sub> entérico é um gás incolor e inodoro produzido pela fermentação dos componentes da dieta ingerida pelo animal ao passar pelo trato digestivo, em que a maior parte, 87% é gerado no rúmen e os 13% restantes produzidos no intestino grosso (MURRAY; BRYANT; LENG, 1976). O CH<sub>4</sub> é produzido pelas bactérias metanogênicas reduzindo H<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> em CH<sub>4</sub> e H<sub>2</sub>O; estas bactérias apesar de não suprirem diretamente nenhuma exigência nutricional contribuem com a retirada e diminuição da pressão de H<sub>2</sub> mantendo o fluxo da fermentação dos carboidratos fibrosos (ST-PIERRE et al., 2015). Apesar da redução de H<sub>2</sub>, a metanogênese representa ao animal perdas de energia, que variam em torno de 2% a 12% (JOHNSON; JOHNSON, 1995; SALMAN; PAZIANI; SOARES, 2006). Convertendo a produção de CH<sub>4</sub> em perdas energéticas, o animal deixa de aproveitar em torno de 9,45 kcal/L de CH<sub>4</sub> produzido (BROUWER, 1965; GUAN et al., 2006).

Além da ineficiência energética pela produção CH<sub>4</sub>, este, aliado a outros gases como CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>O, contribui para o efeito estufa. O setor pecuário se preocupa com a redução da emissão de CH<sub>4</sub>, que apesar de menor concentração na atmosfera, este gás retém 25 vezes mais calor que o CO<sub>2</sub> (OLIVEIRA; IGARASI, 2013). Os GEE recebem atenção por apresentarem a característica de absorver e reter o calor impedindo-o de retornar para a atmosfera, por isso o aumento de sua concentração aquece a superfície terrestre (MOLION, 2008).

Nos ruminantes, o maior consumo de fibra na dieta está diretamente

relacionado com maior produção de CH<sub>4</sub> se comparado com animais recebendo outras fontes alimentares como amido, devido ao tipo de fermentação resultante (KEBREAB et al., 2010). A qualidade da pastagem ingerida também interfere na resposta animal e produção de CH<sub>4</sub>, que aumenta linearmente em pastagens com alta pressão de pastejo e tamanho abaixo do indicado para o tipo de pastagem (SOUZA FILHO et al., 2019).

No intuito de maximizar a eficiência energética da dieta e seu impacto no efeito estufa, várias pesquisas têm sido desenvolvidas na tentativa de reduzir a produção de CH<sub>4</sub>. Desta forma, pode-se manipular a dieta aumentando a inclusão de CNF, reduzindo o tamanho de partícula ou por adição de lipídios e ionóforos, que irão afetar a fermentação ruminal reduzindo CH<sub>4</sub>. As técnicas sempre visam melhor eficiência energética resultando em maior produtividade animal e conseqüentemente diminuição da emissão de CH<sub>4</sub> (JOHNSON; JOHNSON, 1995). Desta forma, sistemas intensificados produzem mais eficientemente carne e leite e ainda contribuem com a redução da emissão de CH<sub>4</sub>.

Em bovinos leiteiros é comum a intensificação e utilização de concentrado em grandes quantidades e silagem objetivando maior produção de leite que, por si só, já reduz a produção de CH<sub>4</sub>. Com aumento da demanda, a pecuária leiteira vem se intensificando nos últimos anos e, com isso, reduziu a proporção entre a emissão de GEE por litro de leite produzido (FAO; GDP, 2018). Já na pecuária de corte, o alto custo da alimentação e da suplementação demandam o uso racional e de forma técnica evitando desperdícios, em que é necessário otimizar ao máximo o uso do pasto que está relacionado com maior produção de CH<sub>4</sub> e, conseqüentemente, maior perda energética. Segundo Detmann, Paulino e Valadares Filho (2010), na pecuária de corte a suplementação estratégica visa corrigir as deficiências nutricionais, maximizar a digestibilidade da matéria seca (MS) e aumentar a conversão alimentar. Muitas vezes, essa suplementação estratégica é acrescida de aditivos alimentares objetivando melhorar ainda mais a eficiência alimentar.

Para aumentar a eficiência produtiva, os aditivos tecnológicos como ionóforos têm sido implementados à dieta para manipular a fermentação ruminal. Os ionóforos são moléculas com efeito antibiótico, produzidas por diversas linhagens de *Streptomyces*, utilizados inicialmente para combater coccídeos em aves e a partir da década de 1970 foram introduzidos na dieta de ruminantes como promotores de desempenho (NICODEMO, 2001; RANGEL et al., 2008).



Segundo Nicodemo (2001), os ionóforos exercem vários efeitos sobre o metabolismo como: melhorar a eficiência energética alterando os tipos de AGV's no rúmen, aumentando propionato e reduzindo acetato e butirato; reduzir a degradação de proteína aumentando o fluxo da proteína alimentar para o intestino delgado e diminuir a incidência de patologias como timpanismo, coccidiose e acidose. A alteração no perfil de AGV's e aumento de propionato está relacionado com menor produção de H<sub>2</sub> e conseqüentemente diminui a produção de CH<sub>4</sub> (RANGEL et al., 2008).

Odongo et al. (2007) acompanharam o fornecimento de monensina sódica por seis meses a vacas de leite e observaram uma redução de 9% (gramas por Kg de peso corporal) na produção de CH<sub>4</sub> em todo período experimental, porém, houve redução da proteína e gordura do leite que não é desejável. Silveira et al. (2016), estudando o efeito da adição de ácidos orgânicos ou monensina sódica na produção de CH<sub>4</sub> por meio da fermentação *in vitro*, observaram que o uso da monensina reduziu a produção desse gás em 60% e ainda aumentou a produção de propionato. A redução de CH<sub>4</sub> também foi encontrada por Perna Junior et al. (2017) que avaliaram *in vitro* a possibilidade de substituição de monensina sódica por taninos de *Acácia mearnsii*. Neste experimento, tanto a monensina sódica como os taninos, foram capazes de reduzir a produção de CH<sub>4</sub> em 10,7% e 8,0% e perda de energia relativa em 23,8% e 20,3% respectivamente. A monensina sódica ainda foi capaz de aumentar a produção propionato em 39,5% em relação ao grupo controle.

A monensina sódica também auxilia melhorando o aproveitamento da proteína alimentar com redução da proteólise resultando em menor concentração de N-NH<sub>3</sub>. Este fato foi observado por Mwenya et al. (2005) ao compararem dietas com alta inclusão de concentrado associado à adição de monensina sódica, Galacto-oligosacarídeos ou L-cisteína em novilhos mantidos em baias metabólicas.

Os ionóforos estão entre os aditivos de uso primário como descrito por Oliveira e Millen (2014) e sua utilização está embasada nos benefícios como os encontrados pelos autores supracitados. Apesar de ter afetado negativamente a composição do leite (ODONGO et al., 2007), em todos os casos houve resultados positivos como aumento de propionato, redução de desaminação e menor produção de CH<sub>4</sub>.

Como os ionóforos são substâncias com ação antibiótica, a sua comercialização exige uma série de regulamentações para liberação, como aprovação do princípio ativo e ter definido o limite máximo de resíduo no alimento de origem

animal, tida como segura à saúde humana (BRASIL, 2009). Apesar das regulamentações, recentemente foi lançada a hipótese de resistência bacteriana devido à utilização de tais substâncias. A resistência bacteriana pelo uso de ionóforos como a monensina sódica não está totalmente elucidada, porém, despertou a preocupação da Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) e da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), que sancionaram em 2015 o Plano de Ação Global sobre Resistência Antimicrobiana. Este plano de ação exigiu dos países signatários, em que o Brasil está incluso, a elaboração de planos de controle voltados para redução e conscientização da utilização indiscriminada dos aditivos antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2015).

Devido à restrição de uso dos antimicrobianos já imposta por órgãos de competência global como a OMS, FAO e OIE, com possíveis riscos para saúde humana, surgiram barreiras comerciais com grandes mercados consumidores como a União Europeia. Neste novo cenário, se faz necessário a busca por aditivos alternativos que sejam bacteriostáticos seletivos, que não gerem resíduos, resistência bacteriana e possíveis danos à saúde humana.

Dentre vários produtos, a própolis produzida por abelhas *Apis mellifera sp.* a partir de exsudatos vegetais, enzimas salivares, cera e outros elementos, possui características que possibilitam sua utilização como manipulador da fermentação ruminal. Dentre as características, pode-se citar: atividade antimicrobiana (PACKER; LUZ, 2007), antifúngica (MARINI et al., 2012) e antioxidante (ALVES; KUBOTA, 2013). A ação antibacteriana da própolis possui atividade mais intensa contra bactérias Gram-positivas como encontrado por Vargas et al. (2004) ao adicionarem extrato de própolis diluído em 50% de álcool em colônias de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Neste experimento, de 81 isolados bacterianos Gram-positivos, 75 (92,60%) foram sensíveis ao extrato de própolis contra 34 (42,50%) dos 80 Gram negativos avaliados. Rezende, Pimenta e Costa (2006), em ensaio *in vitro*, adicionaram extratos de própolis comerciais em cepas de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, também observaram maior sensibilidade de bactérias Gram-positivas mesmo em concentrações baixas do extrato de 1,1 mg/ml, que foi a concentração inibitória mínima. De forma similar, a própolis poderia eliminar ou reduzir as bactérias indesejáveis do rúmen, que são as Gram-positivas.

A ação do extrato de própolis sobre a fermentação tem sido testada

principalmente *in vitro* apresentando resultados satisfatórios equivalentes aos encontrados quando utilizando a monensina sódica. Oliveira et al. (2004) avaliaram a ação da própolis em comparação com monensina sódica pela fermentação de três fontes de nitrogênio (caseína hidrolisada, farelo de soja e farinha de peixe). Neste estudo, a própolis e a monensina sódica foram eficientes em reduzir a produção de amônia e a própolis foi mais eficiente em manter proteína solúvel reduzindo a desaminação. Stradiotti Júnior et al. (2004) também avaliaram a atuação do extrato de própolis sob a fermentação *in vitro* e *in vivo* de caseína hidrolisada e observaram capacidade de reduzir a desaminação dos aminoácidos em que a atividade específica de produção de amônia foi reduzida em até 78% no tratamento contendo extrato de própolis se comparado ao grupo controle e houve maior produção de AGV's totais. Apesar da redução da atividade específica de produção de amônia nas condições analisadas, não houve diferença para as concentrações de N-NH<sub>3</sub>. Já Ozturk et al. (2010) ao adicionarem extrato de própolis utilizando a técnica de simulação ruminal em dieta à base de feno de alfafa (60%) e concentrado (40%), observaram que o extrato de própolis mesmo em pequenas concentrações reduziu em 24% a concentração de N-NH<sub>3</sub> indicando melhor utilização do nitrogênio.

Contudo, a própolis é um produto utilizado por humanos, o que lhe confere um preço relativamente alto e grande valor no mercado mundial. Desta forma, fica inviável a utilização de extrato alcoólico de própolis em animais de produção, principalmente de grande porte como bovinos. Já o resíduo de própolis gerado após extração alcoólica ainda apresenta características antibacterianas como testada por Heimbach et al. (2016), que incubou várias bactérias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* em tubos de ensaio em anaerobiose a 37° C com níveis crescentes de resíduo de própolis (0; 0,625; 0,125; 0,25; 0,5g) em 10 ml de solução de meio de cultura. Constatando após 48 horas de incubação a inibição do crescimento bacteriano de quase todas as cepas analisadas com exceção das *Pseudomonas* (Gram-negativas). O aproveitamento do resíduo é viável diante da quantidade produzida, em que 80% da própolis bruta vira resíduo e é descartado, e mais de 80 toneladas de resíduo estaria disponível para utilização (SANTOS et al., 2003).

Diante da sensibilidade de bactérias Gram-positivas, a própolis e as respostas encontradas como alteração da produção de CH<sub>4</sub>, redução da desaminação de proteína, sua utilização pode ser uma alternativa viável para maximizar o desempenho

animal quando não é possível a utilização dos ionóforos. A ação da própolis para ruminantes ainda não está totalmente elucidada, como as dosagens necessárias, alterações efetivas no ambiente ruminal e não há relatos sobre eficiência da utilização do resíduo da extração alcoólica. Desta forma, ao invés de testar o extrato de própolis, que já possui mercado e alto valor agregado, se torna viável a utilização do resíduo de própolis em bovinos. Porém, requer ainda estudos para avaliar sua atuação na manipulação ruminal, perfil de AGV's, desaminação, produção de CH<sub>4</sub>, produção amônia ruminal, pH e degradação da matéria seca.

Como estudos em bovinos *in vivo* requerem altos investimentos em equipamentos e número de animais e, principalmente aqueles destinados à verificação da produção de gases (AGV's e CH<sub>4</sub>), a técnica *in vitro* de produção de gases é uma alternativa econômica com acurácia comprovada para descrever a cinética da fermentação ruminal (MAURÍCIO et al., 1999). Dessa forma, objetivou-se avaliar pela técnica de produção de gases *in vitro* o efeito do resíduo do extrato de própolis na manipulação ruminal e seu potencial em aumentar a produção de propionato em detrimento de acetato e reduzir a produção de CH<sub>4</sub>. Também, verificar sua ação na degradação da matéria seca da dieta, no pH e no balanço de nitrogênio frente a dietas com níveis crescentes de proteína, tendo como base farelo de soja e silagem de milho.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Embrapa Gado de Leite, no Campo Experimental José Henrique Bruschi - CEJHB nas dependências do Complexo Experimental Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, localizado em Coronel Pacheco - MG. Todos os procedimentos experimentais utilizando animais neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, protocolo número 03/2014 (Anexo A) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais- IF Sudeste MG, protocolo número 13/2018 (Anexo B) .

Foi adquirido da Cooperativa Nacional de Apicultura (CONAP,) situada na cidade de Nova Lima – MG, resíduo da extração de extrato de própolis marrom.

A adição de resíduo (100g) foi avaliada em três ensaios consecutivos pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases descrita por Maurício et al. (1999), adaptada para leitura de produção de gases pelo deslocamento de coluna de água (FEDORAH; HRUDEY, 1983), uso de amostras com 500 mg, frascos de incubação com volume interno de 50 ml e coleta de amostras dos gases para quantificação do metano (CH<sub>4</sub>) (OLIVEIRA et al., 2018; TERRY et al., 2016).

Como doadoras de líquido ruminal para uso na incubação pela técnica *in vitro* de produção de gases, foram utilizadas três vacas Girolando fistuladas no rúmen, mantidas em dieta para nível de manutenção, alimentadas com silagem de milho e dois quilogramas de concentrado (fubá de milho, farelo de soja e núcleo mineral-vitamínico). As vacas doadoras de inóculo ficaram submetidas aos tratamentos com ou sem adição de resíduo de própolis por três períodos experimentais de 14 dias. Em cada período experimental, um animal diferente recebeu 100g de resíduo de própolis e, após os 14 dias de adaptação, foi realizada a coleta dos inóculos com e sem própolis para incubação, repetindo a cada período experimental e trocando o animal a receber a dosagem de própolis.

Para serem incubadas juntamente ao inóculo foram formuladas dietas à base de silagem de milho e concentrado proteico a base de farelo de soja e núcleo mineral. As dietas foram formuladas contendo três níveis de concentrado na matéria seca, sendo: 25%; 50% e 75% de concentrado e como testemunha somente silagem de milho.

Amostras do concentrado e da silagem que compuseram o substrato utilizado foram analisadas quanto aos teores de Matéria Seca (MS) a 105°C, de Proteína Bruta (PB) pelo método Kjeldahl conforme Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia - INCT (2012) e de Fibra em Detergente Neutro (FDN), Fibra em Detergente Ácido (FDA) segundo Van Soest, Robertson e Lewis (1991) utilizando um analisador de fibras Ankom<sup>200</sup> (Ankom Technology Corp, Fairport, NJ, EUA). Também foram analisados Extrato Etéreo (EE) determinado por meio da extração por 8 horas de substâncias solúveis em éter de petróleo, utilizando o método de Soxhlet, Cinzas por combustão em mufla a 600 °C, sendo a matéria orgânica (MO) calculada como a diferença do conteúdo antes e depois da queima completa da amostra (MO = 100 - Cinzas), Amido e Nutrientes Digestíveis Totais (NDT) (COMPÊNDIO ..., 2013) e quantificados os Carboidratos não Fibrosos (CNF) e Energia Digestível (ED) conforme Tabela 1 para concentrado, e dietas utilizadas como substratos.

Tabela 1 - Composição bromatológica do concentrado (farelo de soja e minerais) e silagem de milho que compuseram as dietas utilizadas para incubação *in vitro*. Sendo as dietas compostas de silagem (grupo controle) e níveis crescentes de concentrado (25, 50 e 75% na MS).

Componente	Concentrado	Silagem	Inclusão de concentrado		
			Silagem + 25%	Silagem + 50%	Silagem + 75%
Matéria seca - MS (%)	91,5	34,1	48,5	62,8	77,2
Matéria orgânica (%)	89,5	95,4	93,9	92,4	90,9
Proteína bruta (%MS)	42	9,1	17,3	25,5	33,8
FDA (%MS)	11,5	25,6	22,1	18,5	15
FDN (%MS)	19,8	40,6	35,4	30,2	25
Extrato etéreo (%MS)	1,4	3,2	2,8	2,3	1,9
CNF (%MS)	29,9	43,4	40	36,6	33,3
AMIDO (%MS)	8,9	32,4	26,5	20,6	14,7
NDT (%)	75,9	68,9	70,7	72,4	74,2
ED (Kcal/g)	3,35	3,04	3,11	3,19	3,27

MS = matéria seca; FDA = fibra insolúvel em detergente ácido; FDN = fibra insolúvel em detergente neutro; CNF = carboidratos não fibrosos; NDT = nutrientes digestíveis totais, ED = energia digestível; concentrado composto por 97% de farelo de soja e 3% de núcleo mineral.

O inóculo ruminal foi retirado e transportado em garrafa térmica pré-aquecida. No laboratório, foi realizada a filtração do líquido ruminal com duas camadas de gazes de algodão, submetido a uma injeção contínua de CO<sub>2</sub> e mantido em banho termostático aquecido a 39 °C. Ao inóculo foi adicionado solução tampão na proporção

de 1 ml de líquido de rúmen para cada 6,85 ml de tampão (MENKE et al., 1979). Após preparo da solução, 25 ml foram adicionados aos frascos de 50mL pré-gaseificados com CO<sub>2</sub>, já com as dietas substratos (500 mg) moídas em peneira de 1 mm. Cinco horas antes da incubação, os frascos foram condicionados em câmara com temperatura de 39° C para estabilização da temperatura. Frascos sem extratos (padrão) e frascos contendo somente o líquido ruminal (branco) também foram incluídos em triplicada para cada inóculo e período experimental. Os frascos foram vedados com tampa de silicone e anel de alumínio e ficaram incubados a 39°C por até 96 horas mantendo-se em agitação com 90 movimentos por minuto. Os volumes dentro dos frascos foram aferidos após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72 e 96 horas de incubação, através do deslocamento de coluna de água.

Às 24 horas de incubação, aproximadamente 10 ml de gás foram coletados de cada frasco com auxílio de seringa, transferido para *Exetainer* de 6,8 ml (Labco Ltd., *High Wycombe, Buckinghamshire*, Reino Unido) e encaminhados ao laboratório para a quantificação de CH<sub>4</sub>, empregando cromatografia em fase gasosa (CG) 7 820A (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA) (HOLTSHAUSEN et al., 2009). Os frascos foram abertos e o pH aferido com auxílio de potenciômetro PA 210A (MS Tecnopon Instrumentação, Piracicaba, SP, Brasil). Finalizadas as leituras de produção de gases às 24 ou 96 horas, os resíduos resultantes da incubação foram filtrados em papel filtro sob vácuo para posterior mensuração da degradação *in vitro* da matéria seca a 105 °C, utilizando método gravimétrico.

Após a filtragem, foram coletadas duas amostras da fase líquida de cada frasco e congeladas a -20° C para análise dos Ácidos Graxos Voláteis (AGV's) e Análise de Nitrogênio Amoniacal (N-NH<sub>3</sub>). A concentração de N-NH<sub>3</sub> foi determinada em aparelho micro Kjeldahl por destilação de 2 ml de conteúdo líquido recuperado do frasco de fermentação, utilizando 10 ml de cloreto de potássio a 15%, 2 g de óxido de magnésio e 20 ml de ácido bórico a 4% como solução receptora e ácido clorídrico (0,01 N) como solução para titulação. Os teores de AGV's foram avaliados utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo modelo e 2695 da *Waters Corporation* (MILFORD, MA, USA).

Para o cálculo da energia digestível, considerou-se 1 Kg de NDT igual 4,409 Mcal, conforme descrito por Coelho da Silva e Leão (1979) e, para cálculo de perda de energia como percentual da energia digestível da amostra, considerou-se 9,45 kcal/L de metano (BROUWER, 1965).

Os dados foram submetidos à análise de variância considerando os efeitos da adição ou não de resíduo de própolis.

Os resultados de produções acumuladas de gases *in vitro* foram ajustados empregando o algoritmo de Gauss-Newton ao modelo logístico bicompartimental descrito por Schofield, Pitt e Pell (1994) conforme equação:  $V(t) = Vf1/[1+e^{(2-4c1(L-T))}] + Vf2/[1+e^{(2-4c2(L-T))}]$ , em que: V(t) = representa o volume máximo total de gases produzidos durante a incubação; Vf1 = representa o volume máximo de gases produzidos pela fração de degradação lenta (carboidratos fibrosos – CF); c1 = representa a taxa de produção de gases pela degradação dos CF; L = representa a fase de latência, tempo de colonização ou *lag time* que é a duração de eventos que precedem a degradação da amostra com produção de gases; T = representa o tempo de fermentação; Vf2 = representa o volume máximo de gases produzidos pela fração de degradação rápida (carboidratos não fibrosos – CNF); c2 = representa a taxa de produção de gases pela degradação dos CNF.

Os dados foram analisados considerando os efeitos fixos de aditivo alimentar – A (uso ou não de resíduo de extrato de própolis), do tipo de dieta – FS (níveis de inclusão de concentrado à base de farelo de soja) e da interação entre esses tratamentos – A x FS e efeito aleatório de rodada de incubação (n = 3 rodadas). A significância estatística foi considerada quando  $P \leq 0,05$  e tendência quando  $0,05 < P \leq 0,10$ . As comparações entre os tratamentos de tipo de dieta foram conduzidas quando  $P < 0,05$ , considerando os efeitos linear e quadrático associados aos níveis de inclusão de concentrado à base de farelo de soja (0%, 25%, 50% e 75%). Adicionalmente, foi realizado o estudo de correlação entre as variáveis, empregando o coeficiente de correlação de Pearson ( $P < 0,05$ ).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A produção de gases a partir de carboidratos fibrosos (CF) (Vf1) foi afetada pelos níveis crescentes de concentrado ( $p < 0,05$ ) e pela inclusão de resíduo de própolis ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2). A adição de farelo de soja também afetou a constante c1 (taxa de produção de gases pela fermentação de CF) ( $p < 0,05$ ), reduzindo-a linearmente à medida que o nível de concentrado aumentou. A maior produção de Vf1 ocorreu na maior adição de concentrado associado à presença do resíduo. À medida que se aumenta o farelo de soja nas dietas, a concentração de CF diminui e, assim, se verifica possibilidade de aumento na produção de gás provindo deste carboidrato e o uso do resíduo de própolis maximizou esta variável. A disponibilidade de CNF no rúmen é fundamental para o crescimento microbiano ruminal e maior aporte de proteína microbiana (SILVA CABRAL et al., 2011) e conseqüente maior taxa de fermentação e produção de gases. Desta forma, o aumento de CNF e redução da quantidade de CF a ser fermentada pode ter maximizado a atuação das bactérias celulolíticas e hemicelulolíticas aumentando a produção de Vf1. Este resultado é diferente dos encontrados por Araújo et al. (2018), que analisaram a produção de gases *in vitro* com adição de níveis crescentes de extrato etanoico de própolis em dietas contendo 50% de concentrado a base de milho e soja e 50% de volumoso sendo capim elefante, em que não houve alteração da produção de gases provenientes de dos CF. Assim, infere-se que o extrato etanoico de própolis e o resíduo de própolis de alguma forma produzem respostas diferentes em termos de produção de gás a partir dos carboidratos fibrosos. Possivelmente, este resultado está associado ao álcool presente no extrato, que pode inibir o crescimento bacteriano (CALDWELL; MURRAY, 1986; PATTERSON; RICKE, 2015) que já não está presente no resíduo de própolis.

A produção de gases proveniente da fermentação de carboidratos não fibrosos (CNF) (Vf2) não sofreu influência em função dos tratamentos. Este resultado também é oposto ao encontrado por Araújo et al. (2018), que observaram queda da produção de gases proveniente de CNF quando foi adicionado extrato etanoico de própolis que também pode estar relacionado à presença do álcool do extrato.

O volume total de gases produzidos (Vt) foi maior em função do aumento de inclusão de concentrado ( $p = 0,05$ ) que está relacionado com maior quantidade de carboidratos fermentescíveis, maior PB e energia disponível, o qual diminuiu o

Tabela 2 - Parâmetros de cinética ruminal *in vitro* de dietas com níveis crescentes de concentrado a base de farelo de soja com ou sem uso de aditivo de resíduo de extrato de própolis.

Item	Aditivo (A)	Inclusão Concentrado (FS)				EPM	Valor de P			Efeito Inclusão (FS)	
		0%	25%	50%	75%		A	FS	A x FS	Linear	Quadrático
Vf1 (ml)	Controle	84,2	84,7	96,4	108,4	4,43	0,01	<0,001	0,33	<0,001	0,002
	Resíduo (P)	83	96,9	111	118,7						
c1 (ml/h)	Controle	0,035	0,032	0,029	0,029	0,0019	>0,50	0,01	>0,50	0,002	0,002
	Resíduo (P)	0,036	0,032	0,029	0,03						
Vf2 (ml)	Controle	149,5	152,8	152,7	154,6	6,63	>0,50	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	147,4	153,1	151,6	144,5						
c2 (ml/h)	Controle	0,122	0,11	0,111	0,102	0,006	>0,50	0,21	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	0,116	0,115	0,111	0,109						
Vt (ml)	Controle	233,7	237,5	249,1	263	10,61	>0,50	0,05	>0,50	0,001	0,007
	Resíduo (P)	230,4	250	262,6	263,2						
Lag time (h)	Controle	2,57	2,1	1,66	1,3	0,28	0,12	0,02	>0,50	0,13	0,31
	Resíduo (P)	2,66	2,25	2,08	1,94						
DMS (%)	Controle	63,1	70	72,1	74,6	2,1	0,09	<0,001	0,42	0,02	0,06
	Resíduo (P)	59,1	65,3	68,2	76,3						

Vf1 = volume de gases produzidos pela fermentação de carboidratos fibrosos; c1 = taxa de produção de gases pela fermentação de carboidratos fibrosos; Vf2 = volume de gases produzidos pela fermentação de carboidratos não fibrosos; c2 = taxa de produção de gases pela fermentação de carboidratos não fibrosos; Vt = volume total de gases produzidos pela fermentação da amostra; *Lag time* = tempo de colonização; DMS = desaparecimento de matéria seca às 96 h de incubação; EPM = erro padrão da média.

tempo de colonização (*lag time*) ( $p < 0,05$ ) não sendo afetado pela adição de resíduo de própolis. Este resultado é positivo, pois quando o tempo de colonização é maior e os microrganismos ruminais têm crescimento lento, a energia gerada da fermentação é utilizada na manutenção, não maximizando a síntese dos microrganismos reduzindo assim a eficiência (REGADAS FILHO et al., 2011).

A degradação da matéria seca (DMS) foi maior à medida que houve a inclusão de concentrado ( $p < 0,05$ ), apresentando efeito linear. O uso do farelo de soja aumentou a proporção de nutrientes digestíveis, observados pelo incremento de NDT, o que pode estar relacionado com aumento na digestibilidade da matéria seca. A adição de resíduo de própolis também exerceu tendência ( $p < 0,10$ ) em reduzir a DMS.

A produção de AGV's total não foi alterada pelos tratamentos, porém a relação acetato:propionato foi influenciada pela adição de resíduo de própolis ( $p < 0,05$ ) em que houve maior produção de propionato em detrimento de acetato o que é desejável (Tabela 3). Dietas contendo mais CNF produzem maiores proporções de propionato se comparadas com dietas contendo maiores quantidade CF (EL-WAZIRY, 2007), porém no estudo, mesmo no grupo controle contendo silagem de milho com maior CF, a produção de propionato foi superior nos tratamentos com a adição de própolis.

A adição de resíduo de própolis não afetou o pH ( $p > 0,10$ ) diferentemente da inclusão de concentrado ( $p < 0,05$ ), porém a faixa de pH observada, entre seis e sete, permite o desenvolvimento ruminal de todos os componentes da biomassa microbiana (bactérias, protozoários ou fungos) (HOBSON; STEWART, 1997). Lindberg (1985), descreve que faixa de pH entre seis e oito é compatível com a máxima ação das enzimas dos microrganismos ruminais. Somente quando o pH se encontra abaixo de seis iniciam-se efeitos deletérios sobre a degradação de CF, não sendo desejável (MOULD; ØRSKOV; MANNS, 1983).

A concentração de N-NH<sub>3</sub> não foi alterada pela adição de resíduo de própolis ( $p > 0,10$ ) com relação ao grupo controle, mesmo aumentando os níveis de proteína da dieta, via concentrado. Mas observou-se aumento linear ( $p < 0,05$ ) de N-NH<sub>3</sub> com a inclusão de concentrado na dieta. Estes dados não corroboram com os encontrados por Aguiar et al. (2014), Oliveira et al. (2006) e Ozturk et al. (2010) que, ao avaliarem a ação do extrato de própolis, observaram a redução de N-NH<sub>3</sub>, o que indicou melhor aproveitamento do nitrogênio ruminal.

Tabela 3 - Concentrações e relação de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (acetato, propionato e butirato), índice de pH e concentração de nitrogênio amoniacal às 24 horas incubação com ou sem uso de aditivo de resíduo de extrato de própolis em dietas com níveis crescentes de concentrado a base de farelo de soja.

Item	Aditivo (A)	Inclusão Concentrado (FS)				EPM	Valor de P			Efeito Inclusão (FS)	
		0%	25%	50%	75%		A	FS	A x FS	Linear	Quadrático
AGV total (mmol/L)	Controle	54,9	57,8	50,9	57,7	4,37	>0,50	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	55,2	63,2	53,2	62,8						
Acetato – A (mmol/L)	Controle	33,1	35,3	38,6	36,3	2,52	0,25	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	32,7	37,6	31,6	37,1						
Propionato – P (mmol/L)	Controle	11,8	12,1	11,2	12,4	0,90	0,19	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	14,2	14,6	12,6	14,5						
Butirato (mmol/L)	Controle	10,0	10,4	9,0	9,0	1,33	>0,50	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	8,3	9,1	7,4	11,3						
A:P	Controle	2,8	2,9	2,8	3,0	0,15	0,01	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	2,3	2,3	2,6	2,5						
pH	Controle	6,7	6,8	6,9	7,1	0,04	>0,50	<0,001	>0,50	0,09	0,21
	Resíduo (P)	6,8	6,9	6,9	7,0						
N-NH <sub>3</sub> (mg/dL)	Controle	8,4	11,6	13,2	17,2	0,42	0,31	0,002	>0,50	<0,001	<0,001
	Resíduo (P)	7,8	10,4	13,6	14,4						

AGV = ácidos graxos voláteis; N-NH<sub>3</sub> = nitrogênio amoniacal; EPM = erro padrão da média.

Porém Stradiotti Júnior et al. (2004), ao avaliarem extrato de própolis, não observaram alterações da concentração N-NH<sub>3</sub>, mas observou-se redução de até 78% da atividade específica de produção de amônia, variável que não foi avaliada no presente estudo. Assim, mais estudos precisam ser realizados para investigar se o resíduo de própolis auxilia no aproveitamento do nitrogênio e também estudos que analisam a atividade específica de produção de amônia conforme Stradiotti Júnior et al. (2004).

Analisando os dados encontrados de N-NH<sub>3</sub>, o tratamento contendo apenas silagem já atenderia o nível mínimo de 5 mg/dL de N-NH<sub>3</sub> descrito por Satter e Slyter (1974). Já para Van Soest (1994) é necessária a concentração mínima de 10 mg/ dL de N-NH<sub>3</sub> que seria encontrada já no tratamento com 25% de concentrado e os demais tratamentos estariam sobrando proteína na dieta. Detmann, Paulino e Valadares Filho (2010) já tratam de níveis de N-NH<sub>3</sub> mais elevados em que o mínimo seria de 13 mg/ dL podendo chegar ao ponto ótimo em 15mg/ dL.

A produção de CH<sub>4</sub> cresceu com a inclusão de concentrado em percentual ( $p < 0,05$ ) e ml/ g de MS ( $p < 0,05$ ), porém o resíduo de própolis foi capaz de reduzir a produção de CH<sub>4</sub>, respectivamente para a concentração percentual ( $p < 0,05$ ) e em mL/ g MS ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). O resíduo de própolis também exerceu tendência ( $p < 0,10$ ) em reduzir a produção de CH<sub>4</sub> em mL/ g de MSD.

Neste experimento, a produção de CH<sub>4</sub> diminuiu, mantendo a produção total de gases (Vt) com a adição de resíduo de própolis, diferentes dos dados encontrados por Leopoldino et al. (2007) que, ao testarem extrato de própolis associado a óleo de soja e comparando com outros ionóforos, encontraram uma redução da emissão do CH<sub>4</sub> por reduzir a produção total de gases em 41,4% (9,1mL/ 100 mg de MS) e 35,2% (7mL/ 100mg de MS) para dietas sem e com óleo de soja, respectivamente. Desta forma, o resíduo de própolis se mostrou mais eficiente na redução somente de CH<sub>4</sub> não deprimindo a produção de outros gases e AGV's. Já Ehtesham et al. (2018) observaram que a adição de extrato de própolis aumentou a produção total de gases e reduziu simultaneamente a produção de CH<sub>4</sub>.

Tabela 4 - Produção de metano (CH<sub>4</sub>) *in vitro* como porcentagem dos gases, como volume por unidade de matéria seca e como volume por unidade de matéria seca digestível incubadas, energia contida no metano emitido, perda de energia pelo metano e produção de metano em função da produção de ácidos graxos voláteis com ou sem uso de aditivo de resíduo de extrato de própolis em dietas com níveis crescentes de concentrado a base de farelo de soja.

Item	Aditivo (A)	Inclusão Concentrado (FS)				EPM	Valor de P			Efeito Inclusão (FS)	
		0%	25%	50%	75%		A	FS	A x FS	Linear	Quadrático
CH <sub>4</sub> (%)	Controle	9,2	10,0	10,5	11,1	0,37	0,009	0,007	>0,50	0,16	0,37
	Resíduo (P)	8,8	9,3	9,6	10,0						
CH <sub>4</sub> (mL/g MS)	Controle	10,9	12,1	12,5	12,8	0,43	<0,001	0,040	0,385	>0,50	>0,50
	Resíduo (P)	10,2	10,7	11,3	10,5						
CH <sub>4</sub> (mL/g MSD)	Controle	26,5	29,8	29,0	28,9	2,65	0,098	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	26,2	27,6	25,8	21,4						
Perda de energia por CH <sub>4</sub> (% ED)	Controle	7,4	8,0	8,0	8,1	0,31	0,001	0,376	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	6,8	7,1	7,2	6,6						
CH <sub>4</sub> /AGV total (mL/mol)	Controle	196,6	201,3	186,3	220,8	18,04	0,15	>0,50	>0,50	-	-
	Resíduo (P)	182,9	187,5	136,6	266,0						

MS = matéria seca; MSD = matéria seca degradada; ED = energia digestível; AGV = ácidos graxos voláteis; EPM = erro padrão da média.

A redução da produção de CH<sub>4</sub> com a adição de resíduo de própolis implica em maior retenção de energia e aproveitamento da dieta pelo animal e, em termos práticos, pode significar possibilidade de maior eficiência animal. Analisando a adição de resíduo de própolis sob a produção de CH<sub>4</sub> (%) e a estimativa da perda de energia (% ED) (p<0,05), observa-se que o resíduo de própolis foi eficaz em reduzir a produção de CH<sub>4</sub> em todas as dietas e, conseqüentemente, proporcionar uma menor perda de energia conforme demonstrado na Figura 1.

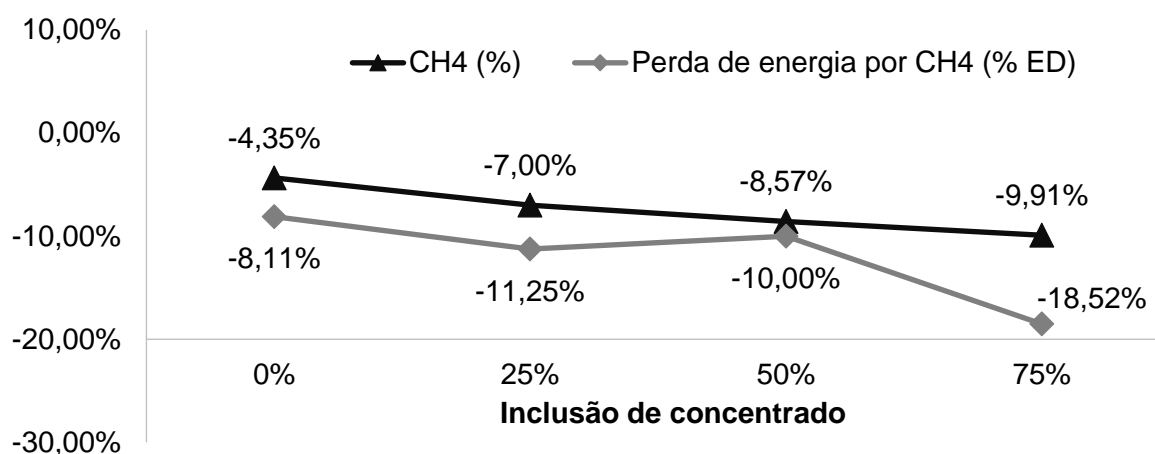


Figura 1 - Redução da Produção de CH<sub>4</sub> e da Perda de Energia (% ED) em função da adição de resíduo de própolis em níveis crescentes de concentrado em relação a dietas sem resíduo de própolis.

Quanto maior a inclusão de concentrado na dieta mais eficiente foi o aditivo (resíduo de própolis) em reduzir a produção de CH<sub>4</sub> e reduzir a perda de energia (% ED) (Figura 1). Em dietas sem o fornecimento do concentrado (farelo de soja), o resíduo de própolis reduziu a produção de CH<sub>4</sub> em 4,35% e reduziu a perda de energia em 8,11%. Já com a inclusão do concentrado ao nível de 75% da dieta, a redução da produção de CH<sub>4</sub> foi de 9,91% e da perda de energia foi de 18,52%. Estes resultados, se extrapolados para animais mantidos sob pastagem ou sob confinamento, são interessantes por reduzir a perda de energia e possibilitar melhor eficiência.

Diante dos dados encontrados e nas condições do experimento, analisando a produção de gases *in vitro*, o resíduo de própolis foi capaz de reduzir a relação acetato: propionato e diminuir a produção de CH<sub>4</sub>. Mas ainda é necessário elucidar o efeito sobre a fermentação de CF e aproveitamento do nitrogênio.

## 6 CONCLUSÃO

O resíduo proveniente do extrato de própolis como aditivo alimentar foi capaz de aumentar a produção de gases da fermentação carboidratos fibrosos (Vf1), não afetando a produção de gases por carboidratos não fibrosos (Vf2) e volume total de gases (VT). O concentrado à base de farelo de soja aumentou a produção de Vf1 e VT não afetando Vf2. O tempo de colonização foi reduzido pela inclusão de concentrado, mas não foi afetado pela adição de resíduo de própolis.

A degradação da matéria seca da dieta (DMS) aumentou com a inclusão de concentrado, mas a adição de resíduo exerceu tendência em reduzir a DMS.

Os tratamentos não afetaram estatisticamente a produção de AGV's, mas o resíduo diminuiu a relação acetato: propionato, aumentando a proporção de propionato em detrimento de acetato.

O pH e N-NH<sub>3</sub> sofreram alteração em função da inclusão do concentrado e não houve diferença em função da adição de resíduo.

A produção de CH<sub>4</sub> foi alterada pelos tratamentos em que o aumento de concentrado aumentou a produção, já o resíduo reduziu a produção em relação ao grupo controle.

Diante dos resultados obtidos, como redução da relação acetato: propionato e diminuição de CH<sub>4</sub> sem afetar a produção de total de gases e sem reduzir a degradação da matéria seca, o resíduo do extrato de própolis se mostrou eficiente em manipular o ambiente ruminal e aumentar a eficiência energética. Tais dados já viabilizam estudos *in vivo*, mas são necessários outros experimentos para comprovar os resultados obtidos e tentar investigar ainda mais os efeitos sobre o aproveitamento do nitrogênio produção de gases.



## REFERÊNCIAS

AGUIAR, S. C. D. et al. Effects of phenolic compounds in propolis on digestive and ruminal parameters in dairy cows. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 43, n. 4, p. 197-206, 2014.

ALVES, E.; KUBOTA, E. H. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 1, p. 37-41, mar. 2013.

ARAÚJO, C. M. D. et al. Gas production and in vitro degradability of sheep diets containing propolis ethanolic extract. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 19, n. 3, p. 277-286, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. Dispõe sobre Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário. **Diário Oficial [da] União**, Brasília, DF, 2009.

BROUWER, E. Report of sub-committee on Constants and Factors. In: EAAP SYMPOSIUM ON ENERGY METABOLISM, 3., 1965, London. **Proceedings ...** London: Academic, 1965. p. 441-443. (Publication n. 11.).

CALDWELL, D. R.; MURRAY, K. Some effects of ethyl alcohol on the growth of rumen bacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 14, n. 4, p. 193-197, 1986.

COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I. **Fundamentos de nutrição dos ruminantes**. Piracicaba: Livroceres, 1979. 380 p.

COMPÊNDIO brasileiro de alimentação animal. São Paulo: Sindirações, 2013.

DETMANN, E.; PAULINO, M. F.; VALADARES FILHO, S. C. Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 7., 2010, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2010. p.191-240.

EHTESHAM, S. et al. Compounds in Iranian propolis extracts on in vitro rumen fermentation, methane production and microbial population. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, Rasht, v. 8, n. 1, 2018.

EL-WAZIRY, A. M. Nutritive value assessment of ensiling or mixing Acacia and Atriplex using in vitro gas production technique. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, Washington, v. 3, n. 6, p. 605-614, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS;  
GLOBAL DAIRY PLATFORM. **Climate change and the global dairy cattle sector:**  
The role of the dairy sector in a low-carbon future. Rome, 2018. 36 p.

FEDORAH, P. M.; HRUDEY, S. E. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. **Environmental Technology**, London, v. 4, n. 10, p. 425-432, 1983.

GUAN, H. et al. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, n. 7, p. 1896-1906, 2006.

HEIMBACH, N. S. et al. Resíduo da extração de própolis como inibidor bacteriano *in vitro*. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, Salvador, v. 17, n. 1, p. 65-72, 2016.

HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. **The rumen microbial ecosystem**. London: Blackie Academic and Professional, 1997. 340 p.

HOLTSHAUSEN, L. et al. Feeding saponin containing *Yucca schidigera* and *Quillajasaponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 6, p. 2809-2821, 2009.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. **Produção da pecuária municipal – 2017**. Rio de Janeiro, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. **Métodos para análise de alimentos**. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2012. 204 p.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, E. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 8, p. 2483-2492, 1995.

KEBREAB, E. et al. Impact of dietary manipulation on nutrient flows and greenhouse gas emissions in cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, p. 458-464, July 2010.

LEOPOLDINO, W. M. et al. Avaliação de ionóforos pela técnica da perda do potássio celular e produção de gases *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 59, n. 6, p. 1516-1522, dez. 2007.

LINDBERG, J. E. Estimation of rumen degradability of feed proteins with the *in sacco* technique and various *in vitro* methods: a review. **Acta Agriculturae Scandinavica**, Stockholm, v. 25, p. 65-97, 1985. Suppl.

MARINI, D. et al. Efeito antifúngico de extratos alcoólicos de própolis sobre patógenos da videira. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 79, n. 2, p.305-308, abr./jun. 2012.

MAURÍCIO, R. M. et al. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 79, p. 321-330, 1999.

MENKE, K. H. et al. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor in vitro. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 217-222, 1979.

MOLION, L. C. B. Aquecimento global: uma visão crítica. **Revista Brasileira de Climatologia**, Presidente Prudente, p. 1-18, ago. 2008. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/revistaabclima/article/viewFile/25404/17024>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

MOULD, F. L.; ØRSKOV, E. R.; MANNS, O. Associative effects of mixed feeds. I. Effects of type and level of supplementation and the influence of the rumen pH on cellulolysis in vivo and dry matter digestion of various roughages. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 10, n. 1, p. 15-30, 1983.

MURRAY, R. M.; BRYANT, A. M.; LENG, R. A. Rates of production of methane in the rumen and large intestine of sheep. **British Journal of Nutrition**, London, v. 36, n. 1, p. 1-14, 1976.

MWENYA, B. et al. Comparing the effects of  $\beta$ 1-4 galacto-oligosaccharides and L-cysteine to monensin on energy and nitrogen utilization in steers fed a very high concentrate diet. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 118, n. 1/2, p. 19-30, 2005.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. (Documentos, 106).

ODONGO, N. E. et al. Long-term effects of feeding monensin on methane production in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 90, n. 4, p. 1781-1788, 2007.

OLIVEIRA, B. S. et al. In vitro screening of plants from the Brazilian Caatinga biome for methanogenic potential in ruminant nutrition. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 25, n. 35, p. 35538-35547, 2018.

OLIVEIRA, C. A.; MILLEN, D. D. Survey of the nutritional recommendations and management practices adopted by feedlot cattle nutritionists in Brazil. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 197, p. 64-75, 2014.

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

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**, Viçosa, MG, v. 33, n. 2, p. 504-510, 2004.

OLIVEIRA, R. C.; IGARASI, M. S. Utilização de óleos essenciais na mitigação da metanogênese. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 7, n. 6, p. 229, 2013.

OZTURK, H. et al. Effects of propolis on in vitro rumen microbial fermentation. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, Ankara, v. 57, n. 4, p. 217-221, 2010.

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

PATTERSON, J. A.; RICKE, S. C. Effect of ethanol and methanol on growth of ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, New York, v. 50, n. 1, p. 62-67, 2015.

PERNA JUNIOR, F. et al. Effect of tannins-rich extract from *Acacia mearnsii* or monensin as feed additives on ruminal fermentation efficiency in cattle. **Livestock Science**, Oxford, v. 203, p. 21-29, 2017.

RANGEL, A. H. N. et al. Utilização de ionóforos na produção de ruminantes. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, João Pessoa, v. 8, n. 1 p. 264-273, jan./fev. 2008.

REGADAS FILHO, J. G. L. et al. Degradation kinetics and assessment of the prediction equation of indigestible fraction of neutral detergent fiber from agroindustrial byproducts. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 9, p. 1997-2004, 2011.

REZENDE, G. P. S. R.; PIMENTA, F. C.; COSTA, L. R. R. S. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, Piracicaba, v. 5, n. 16, p. 967-970, jan./mar. 2006.

SALMAN, A. K. D.; PAZIANI, S. F.; SOARES, J. P. G. **Utilização de ionóforos para bovinos de corte**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2006. Documentos (INFOTECA-E).

SANTOS, A. V. et al. Valor nutritivo do resíduo de própolis para frangos de corte. Nutritive value of propolis residue for broiler chickens. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 27, n. 5, p. 1152-1159, 2003.

SATTER, L. D.; SLYTER, L. L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. **British Journal of Nutrition**, London, v. 32, n. 7, p. 199-205, 1974.

SCHOFIELD, P.; PITT, R. E.; PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from *in vitro* gas production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, p. 2980-2991, 1994.

SILVA CABRAL, L. et al. Simulation and validation of the ruminal digestion of carbohydrates in cattle from kinetic parameters obtained by *in vitro* gas production technique. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 40, n. 9, p. 1984-1990, 2011.

SILVEIRA, A. M. et al. Effect of organic acids or monensin-sodium addition on fatty acid production of short chain and methane through the ruminal fermentation “*in vitro*”. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 1, p. 439-448, 2016.

SOUZA FILHO, W. A. N. et al. Mitigation of enteric methane emissions through pasture management in integrated crop-livestock systems: Trade-offs between animal performance and environmental impacts. **Journal of Cleaner Production**, Amsterdam, v. 213, p. 968-975, 2019.

ST-PIERRE, B. et al. Toward the identification of methanogenic archaeal groups as targets of methane mitigation in livestock animals. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, p. 776, 2015.

STRADIOTTI JÚNIOR, D. et al. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal<sup>1</sup>. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 33, n. 4, p. 1086-1092, 2004.

TERRY, S. A. et al. Effects of *Tithonia diversifolia* on *in vitro* methane production and ruminal fermentation characteristics. **Animal Production Science**, Melbourne, v. 56, p. 437-441. 2016.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2<sup>nd</sup> ed. Ithaca: Cornell University, 1994. 476 p.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 10, p. 3583–3597, Oct. 1991.

VARGAS, A. C. et al. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” de extrato alcólico de própolis. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 159-163, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Geneva, 2015.

## ANEXOS

### ANEXO A - Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**  
**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Procedimentos para fistulação ruminal de bovinos e ovinos para estudos de parâmetros fisiológicos e ensaios de digestibilidade in vitro, ruminal in situ, e coleta de inóculo para isolamento de microrganismos ruminais.**", Protocolo N° **03/2014**, sob a responsabilidade de **Jailton da Costa Carneiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Leite, em reunião de **09/10/2015**.

Vigência do Projeto	De 09/10/2015 a 09/10/2017
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> /Bovino
N° de Animais	12 Bovinos e 6 ovinos
Peso/Idade	Bovinos de 10 meses e 180Kg e Ovinos de 8 meses
Sexo	Machos ( ) Fêmeas ( X )
Origem	Biotérios da Embrapa Gado de Leite ( X ) Frigorífico ( )

Virginia de Souza Columbiano Barbosa  
Secretária Administrativo da CEUA/EGL 2016

**Embrapa Gado de Leite**

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 Juiz de Fora/MG Telefone: (32) 3311-7405 Fax: (32) 3311-7401 [cnpqg.ceua@cnpqg.embrapa.br](mailto:cnpqg.ceua@cnpqg.embrapa.br)

**ANEXO B - Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais- IF Sudeste MG.**



**INSTITUTO  
FEDERAL**

Sudeste de Minas Gerais

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO SUDESTE DE MINAS GERAIS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

---

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que a proposta intitulada "**Efeito da adição de resíduo de própolis em níveis crescentes na dieta de bovinos avaliados pela técnica de in vitro de produção de gases**", registrada com protocolo o nº 13/2018 sob a responsabilidade de Rafael Monteiro Araújo Teixeira que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais- IF Sudeste MG, em reunião de 26 de abril de 2018.

<b>Finalidade</b>	<b>( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica</b>
<b>Vigência da autorização</b>	18/08/2017 a 31/07/2018
<b>Espécie/linhagem/raça</b>	Bovinos
<b>Nº de animais</b>	4
<b>Peso/ Idade</b>	Média de 500 Kg e 3 anos de idade
<b>Sexo</b>	Fêmeas
<b>Origem/local</b>	EMBRAPA/Campo Experimental José Henrique Bruschi - CEJHB

---

*Cláudia Aparecida Patrício Moreira  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais do IF Sudeste MG  
Portaria R – nº 1369/2017  
07 de dezembro de 2017*