

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRÓPOLIS COMO ADITIVO NUTRICIONAL EM DIETAS
CONTENDO ÓLEO DE SOJA PARA VACAS EM
LACTAÇÃO: PARÂMETROS DIGESTIVOS E
ESTABILIDADE E QUALIDADE DO LEITE

Autor: Fábio José Maia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Maria Zeoula

MARINGÁ
Estado do Paraná
maio – 2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

PRÓPOLIS COMO ADITIVO NUTRICIONAL EM DIETAS
CONTENDO ÓLEO DE SOJA PARA VACAS EM
LACTAÇÃO: PARÂMETROS DIGESTIVOS E
ESTABILIDADE E QUALIDADE DO LEITE

Autor: Fábio José Maia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lúcia Maria Zeoula

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
maio – 2013

Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante...

Dê o melhor de você assim mesmo.

E veja você que, no final das contas...

É entre VOCÊ e DEUS...

Nunca foi entre você e as outras pessoas!

Madre Teresa de Calcutá
(Entre você e Deus)

À minha esposa, por me ouvir, entender e compartilhar comigo todos os momentos. Por todo o amor que dedica a mim, por me apoiar, aconselhar, estar sempre ao meu lado e por todas as palavras de motivação.

À nossa filha Mariana, presente maravilhoso de Deus, que chegou para abençoar nossas vidas e nos mostrar por meio da pureza e inocência de um sorriso, que somos muito mais fortes e capazes do que acreditamos ser.

À minha família, especialmente meus pais José e Ana Maia, pessoas queridas e que sempre estão ao meu lado dispostos a me ajudar incondicionalmente.

E enfim, a todos que realizam seu trabalho de forma honesta e realmente acreditam no que fazem, que mesmo quando não encontram exatamente aquilo que procuram não se intimidam e seguem em frente em busca da verdade.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as bênçãos que me concede.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, pela oportunidade e realização deste trabalho.

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

À Prof.^a Dr.^a Lúcia Maria Zeoula, pela amizade, pelos ensinamentos, por me receber como orientado, membro de sua equipe de pesquisa e por confiar no meu trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Selma L. Franco, Prof.^a Dr.^a Lucimar P. Peres e Prof.^a Dr.^a Paula T. M. Pinto, pela parceria e contribuição para a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Antonio Ferriani Branco, por apoiar a realização deste doutorado; Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, pela colaboração nos experimentos e Dr. Elias Nunes Martins, pela contribuição com as análises estatísticas dos dados.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UEM, pelos ensinamentos.

Ao professor Jesuí Vergílio Visentainer e membros de sua equipe, Paula Fernandes Montanher e Solange Maria Cottica, pelo apoio nas análises químicas.

Aos meus bons velhos amigos Jorge e Selma Puríssimo, Claudomiro e Marlene Tavares, Sandra Regina Dias Ferreira e Cássia Facholi, por me acolherem com muito carinho na chegada a Santo Anastácio - SP e apoiarem meu retorno a Maringá.

Aos bons novos amigos, Eduardo Marostegan de Paula, Rafael Barreiros Samensari, Emerson Henri Yoshimura e Sílvia Cristina de Aguiar, pelas muitas e longas conversas, por toda dedicação na condução dos experimentos, pelos ensinamentos e pelos momentos de convívio.

Aos membros do nosso grupo de pesquisa Nadine W. dos Santos, Érica Machado, Bruno H. Monteiro, Hugo Monteiro, Bruno Abreu. De modo muito especial à Lucelia de Moura Pereira e Bruna Calvo Agustinho, pela dedicação e amizade.

A Sandro José Paixão e Josinaldo Zanotti, por todo o esforço despendido na condução do experimento, pela dedicação e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos amigos Luciano Soares de Lima, Ana Paula Silva Ton, André Luiz Dias Garcia e Cleverson de Souza, por toda ajuda e pelos bons momentos juntos.

Ao Sr. Luiz Gregório, pelo espaço cedido em sua propriedade para realização de parte deste grande projeto e Eduardo Lisbinski e Bruna Boito, por toda a colaboração.

Às funcionárias do Laboratório de Alimentos e Nutrição Animal, Creuza Azevedo e de modo muito especial à Cleuza Volpato, pelo auxílio nas análises químicas. Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi Ezupério Salim da Silva, Vicente Faleiros e Célio Aparecido Passolongo pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Denílson Vicentin e Rose Pepinelli, pelos serviços prestados.

E, a tantos outros que contribuíram de forma direta ou indireta na realização deste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS!

BIOGRAFIA

Fábio José Maia, filho de José Maia e Ana de Freitas Maia, nasceu em Mandaguari - Paraná, no dia 14 de agosto de 1979.

Em março de 1997, iniciou no curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá - Estado do Paraná, concluído em dezembro de 2001.

Em março de 2002, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes. No mês de maio de 2004, submeteu-se à banca examinadora para defesa da Dissertação de mestrado.

No período de outubro de 2003 a fevereiro de 2010, trabalhou como Zootecnista na Potensal – Nutrição e Saúde Animal Ltda., onde ocupou o cargo de responsável técnico atuando no desenvolvimento e registro de suplementos minerais e rações para alimentação animal e treinamento de equipe técnico/comercial.

Em fevereiro de 2010, desligou-se da empresa para retomar a vida acadêmica dando início ao curso de Doutorado, em março do mesmo ano, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de Nutrição de Ruminantes.

No mês de fevereiro de 2013, submeteu-se à banca examinadora para o Exame Geral de Qualificação, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

No mês de maio de 2013, submeteu-se à banca para defesa da Tese.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
I INTRODUÇÃO.....	5
1 – Propriedades e aplicações da própolis.....	5
2 – Flavonoides – principais compostos ativos da própolis	7
2.1 - Metabolismo dos flavonoides	8
2.2 - Atividade antibacteriana.....	11
2.3 - Atividade antioxidante	12
2.4 - Oxidação lipídica	13
3 – Própolis e compostos fenólicos na produção de ruminantes.....	15
4 – Estudos com extrato seco de própolis na Universidade Estadual de Maringá.....	18
Referências	22
II OBJETIVOS GERAIS	26
III Digestibilidade dos nutrientes, composição em ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas recebendo produto à base de própolis	27
Resumo	27
Introdução.....	29
Material e métodos	30
Resultados e discussão	40
Conclusão	49
Referências	50
IV Digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais de vacas leiteiras recebendo própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso	53

Introdução.....	55
Material e métodos	56
Resultados e discussão	63
Conclusão	71
Referências	72
V Composição em ácidos graxos e atividade antioxidante do leite de vacas que receberam própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso	75
Introdução.....	77
Material e métodos	78
Resultados e discussão	86
Conclusões.....	93
Referências	94
CONSIDERAÇÕES FINAIS	97

RESUMO

Os efeitos de um produto à base de própolis (PBP) sobre a digestibilidade, parâmetros ruminais e sanguíneos, eficiência de síntese de proteína microbiana, produção, composição química, composição em ácidos graxos (AG) e capacidade antioxidante do leite foram avaliados por meio da realização de dois experimentos. Primeiramente, três doses de um PBP foram adicionadas à dieta de vacas em lactação com o objetivo de avaliar o consumo de matéria seca, os coeficientes de digestibilidade total dos nutrientes, a eficiência de síntese de proteína microbiana, parâmetros sanguíneos, composição química e em AG, concentração de compostos fenólicos, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa do leite. Quatro vacas da raça Holandesa, múltiparas, com peso corporal (PC) médio e desvio padrão de $564,44 \pm 61,39$ kg e aproximadamente 210 dias de lactação foram distribuídas em quadrado Latino 4x4 de acordo com os tratamentos: 1) DDF0 - dieta basal sem adição de própolis; além de três doses diárias de flavonoides totais quantificados em apigenina, que representaram os demais tratamentos: DDF37 – 37,82 mg/dia de flavonoides totais, DDF63 – 63,04 mg/dia de flavonoides totais e DDF88 – 88,25 mg/dia de flavonoides totais. Estas doses foram estabelecidas com base em resultados obtidos em experimentos anteriores, em que uma dose inicial do produto foi testada para os mesmos parâmetros avaliados neste estudo. O óleo de soja foi utilizado como fonte de AG poli-insaturados e representou 2,23% da composição da dieta. O fornecimento do PBP influenciou ($P < 0,05$) a digestibilidade total da proteína bruta, fibra em detergente neutro e extrato etéreo, que apresentaram comportamento quadrático ($P < 0,05$) em relação à dose do PBP adicionado à dieta. A digestibilidade total dos demais nutrientes e a eficiência de síntese de proteína bruta microbiana não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos tratamentos. De modo geral, a adição de própolis não influenciou ($P > 0,05$) as concentrações plasmáticas dos metabólitos sanguíneos relacionados ao metabolismo de proteína, carboidratos e lipídios, com exceção do efeito quadrático ($P < 0,05$) verificado para a concentração do HDL. Não houve efeito ($P > 0,05$) das doses de flavonoides sobre a composição percentual ou a produção diária de gordura, proteína, lactose e sólidos totais. O aumento do consumo de flavonoides totais influenciou a composição em AG da gordura do leite de vacas consumindo dietas contendo óleo de soja como fonte de AG poli-insaturados. As concentrações de compostos fenólicos (flavonoides totais e polifenóis), a atividade antioxidante do leite, medida por meio da redução do ferro, e a estabilidade oxidativa

determinada por meio da concentração de dienos conjugados não foram influenciadas ($P>0,05$) pela dose do PBP. Contudo, foi verificado efeito linear ($P<0,05$) da dose de flavonoides sobre a atividade antioxidante determinada por captura radicalar (ORAC). Com base nestes resultados, foi proposto o segundo experimento que avaliou o papel do rúmen sobre o metabolismo dos AG poli-insaturados e dos compostos fenólicos, quando um PBP e óleo de soja foram administrados no rúmen ou no abomaso de vacas leiteiras. Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, multíparas, canuladas no rúmen, com peso corporal médio e desvio padrão de $570,95\pm 46,78$ kg e aproximadamente 203 dias de lactação, distribuídas em quadrado Latino 4×4 de acordo com os tratamentos: PR/OR – própolis e óleo de soja no rúmen, Abo/Abo – própolis e óleo de soja no abomaso, PR/OA – própolis no rúmen e óleo no abomaso e PA/OR – própolis no abomaso e óleo no rúmen. O local de administração da própolis e do óleo não interferiu ($P>0,05$) nos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes. A administração ruminal da própolis isoladamente ou associada ao óleo de soja manteve a produção total de ácidos graxos de cadeia curta, o pH e concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen e não teve efeito ($P>0,05$) sobre a composição do leite. Porém, a perfusão abomasal do óleo provocou alteração na composição em AG e redução no percentual de gordura do leite, que não sofreram interferência da própolis. O local de perfusão do PBP não alterou ($P<0,05$) as concentrações de flavonoides e polifenóis e não melhorou a atividade antioxidante do leite. Os resultados desta pesquisa indicam que os compostos fenólicos da própolis interferem na digestibilidade de parte dos nutrientes da dieta e apresentam potencial para serem utilizados como aditivos capazes de interferir na estabilidade oxidativa do leite. No entanto, doses de até 63,04 mg de flavonoides/dia são mais recomendadas para melhorar as características relacionadas à digestibilidade dos nutrientes, enquanto a atividade antioxidante se mostrou dose dependente.

Palavras-chave: aditivo, atividade antimicrobiana, estabilidade oxidativa, extrato de própolis, flavonoides, polifenóis

ABSTRACT

The antimicrobial and antioxidant effects of a dried extract made from a product-based propolis on digestibility, ruminal and blood parameters, efficiency of microbial protein synthesis, production, composition, fatty acid composition (FA) and antioxidant capacity of milk were evaluated in two experiments. In the first experiment, three doses of the propolis dry extract were added in diet of dairy cows to evaluate the antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds present in propolis. Therefore, dry matter intake, total nutrients digestibility, efficiency of microbial protein synthesis, blood parameters, production, composition, FA composition, concentration of total flavonoids and phenolic acids and antioxidant capacity of milk were determined. Four Holstein cows, multiparous, with average body weight of 564.44 ± 61.39 kg and approximately 210 days in milk were assigned in a 4x4 Latin square according to the following treatments: DDF0 - basal diet without the addition of propolis, DDF37 - 37.82 mg/day of apigenin measured in total flavonoids, DDF63 - 63.04 mg/day of apigenin measured in total flavonoids and DDF88 - 88.25 mg/day of apigenin measured in total flavonoids. Soybean oil was used as a source of polyunsaturated fatty acids and added at 2% in diet composition. The doses proposed were based on results obtained in previous experiments, in which an initial dose of propolis based-product was tested for the same parameters evaluated in this study. The supply of soybean oil and propolis affected ($P < 0.05$) dry matter intake. Total digestibility of crude protein, ether extract and total digestible nutrients showed quadratic effect ($P < 0.05$) in relation to the dose of propolis and total digestibility of other nutrients was not affected ($P > 0.05$), as well as other parameters related to nitrogen metabolism in the rumen, which were evaluated by total allantoin excretion, purine absorption and synthesis of microbial crude protein. In general, the addition of propolis did not influence ($P > 0.05$) plasmatic concentrations of blood metabolites related to the metabolism of dietetic protein, carbohydrates and lipids, except for the HDL concentration. There was no effect ($P > 0.05$) of flavonoids doses on milk production or daily production and percentage of fat, protein, lactose and total solids. The increase in total flavonoid intake from the propolis dry extract has changed fatty acid composition of milk fat in diets containing soybean oil as source of polyunsaturated fatty acids. Concentration of phenolic compounds (flavonoids and total polyphenols) and oxidative stability of milk, measured by the iron reduction and concentration of conjugated dienes (CD), were not

affected ($P>0.05$) by doses of propolis. However, there was effect ($P<0.05$) of propolis dose on the oxidative stability of milk. Based on these results, it was proposed a second trial to evaluate the role of rumen on the metabolism of phenolic compounds and polyunsaturated fatty acids, when propolis dry extract and soybean oil were administered in the rumen and/or abomasum of dairy cows. Four Holstein cows, multiparous, cannulated in rumen, with 570.95 ± 46.78 kg of average body weight and approximately 203 days in milk, were assigned in a 4x4 Latin square according to the following treatments: PR/OR - propolis and soybean oil administered in the rumen, Abo/Abo - propolis and soybean oil perfused in the abomasum, PR/OA – propolis administered in the rumen and oil perfused in the abomasum and PA/OR – propolis perfused in the abomasum and oil administered in the rumen. The site of propolis and oil administration did not affected ($P>0.05$) the coefficients of total digestibility of nutrients. Propolis in the rumen singly or in combination with soybean oil has maintained the total production of short chain fatty acids, pH and ammonia concentration in the rumen. The local of propolis administration had no effect ($P>0.05$) on milk production and composition; however, the abomasal oil infusion reduced milk fat concentration. Milk fatty acids composition was altered ($P>0.05$) by the site of oil infusion but not by propolis. The concentrations of antioxidant compounds and oxidative profile of milk were not affected ($P>0.05$) by the site of propolis perfusion. The use of propolis- based product in dairy cows diets influences dry matter intake and digestibility of fiber, protein, ether extract and improves milk oxidative stability. Intermediary doses appear to be more recommended to improve the characteristics related to intake and total digestibility of nutrients, while oxidative stability was dose-dependent. Propolis has potential to be used as antimicrobial and antioxidant additive because affects the milk oxidative stability and digestibility of nutrients.

Keywords: additive, antimicrobial activity, flavonoids, oxidative stability, polyphenols, propolis extract

I - INTRODUÇÃO

A demanda crescente por produtos de origem animal levou a intensificação dos processos de produção e, conseqüentemente, ao uso de tecnologias que permitissem maximizar o desempenho produtivo dos animais. Como parte desse processo de transformação, o uso de aditivos com o intuito de melhorar a eficiência alimentar e potencializar o desempenho é uma alternativa frequentemente adotada nos sistemas de produção de ruminantes.

Apesar dos benefícios gerados no que diz respeito ao incremento na produção, muitos mercados consumidores de produtos de origem animal estão restringindo o uso de parte dos aditivos antimicrobianos e criaram novas regras para o comércio internacional de carnes e derivados lácteos. Embora estas exigências não sejam características comuns a todos os mercados consumidores, estes novos padrões desencadearam a busca por adequação dos mercados produtores em nível global. Este comportamento estimula a comunidade científica a buscar novas opções de aditivos, que possam complementar ou substituir aqueles já disponíveis.

Várias linhas de pesquisa são propostas no intuito de investigar a possibilidade do uso de compostos naturais como aditivos alimentares. De modo geral, estes compostos apresentam em sua composição elementos com função antimicrobiana, antioxidante ou que atuam no sistema imunológico dos animais. Neste sentido, a própolis tem ganhado posição de destaque uma vez que agrega todas essas ações, entre outras.

1 – Propriedades e aplicações da própolis

A composição química da própolis é bastante complexa e inclui mais de 300 compostos (Khalil, 2006), que podem ser organizados em grupos como: açúcares,

álcoois, aldeídos, ácidos e ésteres alifáticos, ácidos graxos (AG), aminoácidos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, esteroides, cetonas, charconas e di-hidrocharconas, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas), terpenoides e outros (Lima, 2006), além de elementos minerais como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês e pequenas quantidades de vitaminas B1, B2, B6, C e E (Pietta, 2002).

As proporções destes elementos interferem diretamente nas características físico químicas do produto e estão relacionadas a fatores que vão desde as características das espécies vegetais da região em que a matéria-prima para sua produção é coletada (Bankova, 2005), até a finalidade para a qual é utilizada no interior da colmeia, onde é empregada como composto antibacteriano, antifúngico e anti-viral (Bankova, 2000). Isto deixa claro que o uso da própolis na colmeia não é simplesmente mecânico, visando o fechamento de frestas e buracos, mas também químico, sendo responsável pela manutenção do ambiente interno com menor incidência de bactérias e fungos que a atmosfera exterior (Lima, 2006).

Existe uma relação intrínseca entre a composição química da própolis, suas propriedades biológicas e os constituintes químicos da planta em que foi coletado o material para sua elaboração. Esta relação é tão forte que Bankova (2005) ao abordar a diversidade química da própolis e as dificuldades relacionadas à sua padronização, concluiu que embora não seja possível uma padronização universal para este produto em razão da sua variabilidade, seria possível ao menos formular tipos de própolis diferentes de acordo com a fonte vegetal onde foi coletado o material e o perfil químico correspondente.

Embora caracterizada pela complexidade de sua composição e pela dificuldade de padronização em razão da forma como é coletada e processada pelas abelhas, suas propriedades têm feito da própolis um produto usado na medicina popular durante séculos e, mais recentemente, atraído a atenção da indústria médica e cosmética. Além disso, é amplamente utilizada em alimentos e bebidas com a afirmação de que pode manter ou melhorar a saúde humana (Khalil, 2006). Em revisão a respeito das propriedades biológicas da própolis Burdock (1998) afirma que por apresentar ação antisséptica, antimicótica, adstringente, colérica, espasmolítica, anestésica e antioxidante, a lista de aplicações e produtos que incluem própolis em sua composição é quase interminável. Outras propriedades farmacológicas da própolis já foram relatadas há décadas e incluem sua atuação como agente hipotensor, bactericida, bacteriostático, anti-inflamatório e estimulante do sistema imune (Ghisalberti, 1979).

As aplicações médicas da própolis têm levado ao aumento no interesse pelo conhecimento da sua composição química e origem botânica, basicamente por causa do seu conteúdo em polifenóis, principalmente os flavonoides e seus derivados (Franchi et al., 2012). Em razão disto, um grande número de estudos a respeito dos constituintes da própolis e suas ações são publicados nas mais variadas áreas de interesse científico. Pesquisadores de todo o mundo estão buscando nos compostos biologicamente ativos da própolis alternativas para o tratamento de doenças respiratórias (Drago et al., 2007), tratamento dentário (Santos et al., 2002), prevenção da proliferação de células cancerígenas (Kuo et al., 2006, Kimoto et al., 2001), influencia na transcrição de genes e ação de enzimas envolvidas no processo inflamatório (Song et al., 2002), efeito imuno modulatório e na produção de anticorpos (Sforcin et al., 2005), ativador de enzimas com atividade antioxidante como catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase (Lee et al., 2003) e até mesmo, suposta ação contra o vírus HIV tipo 1 (Gekker et al., 2005).

Embora a composição química seja um dado extremamente importante, as proporções entre as centenas de compostos já caracterizados na própolis podem resultar em atividades farmacológicas diversas. Além disso, Lima (2006) afirma que não é apenas o conteúdo em flavonoides que determina as propriedades farmacológicas da própolis, mas que outros compostos também estão relacionados às suas propriedades.

Sem dúvida, a ação contra microrganismos é uma das propriedades essenciais da própolis e é utilizada pelo homem há muito tempo (Bankova et al., 2000). Com o objetivo de usufruir desta e outras características da própolis, este composto natural é testado como aditivo nutricional incluído às dietas de ruminantes e não ruminantes. Além da ação antimicrobiana, as propriedades antioxidantes e imuno moduladoras da própolis despertam interesse de pesquisadores quanto às possibilidades de aplicação deste composto como aditivo capaz de melhorar a saúde, o desempenho e a qualidade do leite de vacas.

2 – Flavonoides – principais compostos ativos da própolis

Os flavonoides são moléculas orgânicas presentes em células vegetais, sendo facilmente encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, caules e flores (Cos et al., 2006), bem como no chá, vinho, mel e própolis (Grange & Davey, 1990). Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos

compostos fenólicos presentes em alimentos, plantas e outros compostos como a própolis, por exemplo. Porém, ainda enfrentam muitos problemas metodológicos, pois além de englobarem uma gama enorme de substâncias, os compostos fenólicos são na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos, e suscetíveis à ação de enzimas (King & Young, 1991).

Existe grande número de constituintes polifenólicos na própolis e seus extratos que são bem conhecidos por suas atividades biológicas. Estes compostos são divididos em classes como ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas, proantocianinas, flavonoides, favonois, flavonas, flavanois, flavanonas, isoflavonas, estilbenos e lignanas (Manach et al., 2005).

Dentre as inúmeras classes de compostos incluídos no grupo dos polifenóis, vale destacar a importância dos flavonoides, que segundo Cushnie & Lamb, (2005) representam uma classe de produtos naturais com vasta gama de propriedades farmacológicas, com destaque para sua ação antioxidante. De acordo com definição de Behling et al. (2004), o termo flavonoide é um nome coletivo dado ao grupo de compostos constituídos de um esqueleto de difenil propano (C₆C₃C₆) com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (Figura 1).

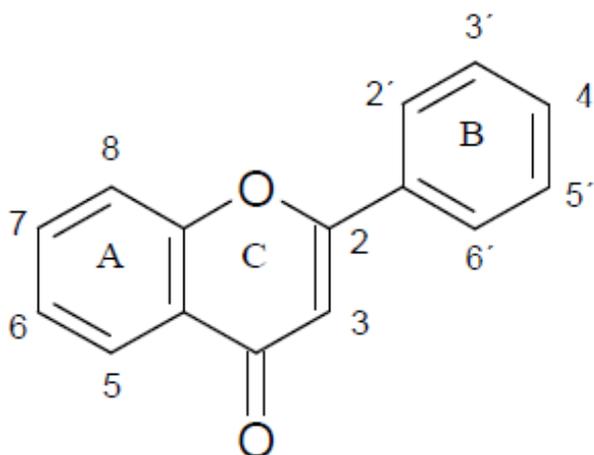


Figura 1 – Estrutura básica dos flavonoides (Adaptado de Behling et al., 2004).

2.1 - Metabolismo dos flavonoides

Embora sejam compostos bastante conhecidos e que desempenham inúmeras funções no organismo, a biodisponibilidade e os fatores interferentes, os mecanismos de

absorção intestinal e o metabolismo dos flavonoides ainda estão longe de serem completamente esclarecidos (Behling et al., 2004), especialmente no caso dos ruminantes em que as informações ainda são bastante limitadas.

Horst & Lajolo (2008) propõem que uma abordagem completa sobre a atividade biológica dos flavonoides deve envolver o estudo da sua biodisponibilidade, englobando a absorção, distribuição, metabolismo, tempo de meia vida efetiva, os mecanismos de ativação e inativação e a excreção do composto. Pois na visão dos autores, um bioativo pode apresentar atividade biológica *in vitro*, porém, pode não ser biodisponível ou ser rapidamente metabolizado e excretado, tornando-se ineficaz *in vivo*.

De modo geral os flavonoides podem ser encontrados na forma glicosilada ou aglicona e, acredita-se que esta característica interfira no mecanismo e na eficiência de absorção. Para Murota & Terao (2003) a forma glicosilada dos flavonoides é dificilmente absorvida, devido principalmente a sua hidrofiliçidade, e passa intacta pelo intestino delgado. No ceco e cólon é hidrolisada pelas enterobactérias e libera a aglicona correspondente. Nesta forma, os flavonoides podem ser absorvidos mais facilmente pelas células epiteliais do intestino grosso devido a sua lipofiliçidade, que facilita a passagem pela camada fosfolipídica da membrana celular. Após absorção e liberação na corrente sanguínea são submetidos a metilação, glucuronidação e/ou sulfatação no fígado. Uma parte substancial desses metabólitos pode então ser excretada na bile e retornar ao lúmen intestinal sendo novamente hidrolisada e reabsorvida pelas células intestinais, ou excretado nas fezes.

Existem ainda muitos questionamentos a respeito dos possíveis mecanismos de absorção dos flavonoides, da eficiência e dos locais onde ocorrem. O tipo de flavonoide, sua solubilidade e a forma como são encontrados na dieta, aglicona ou glicosilada, parecem ser decisivos em relação ao mecanismo de absorção e ao local onde ocorre.

Pesquisas a respeito da absorção de diferentes formas dos flavonoides envolvendo espécies de não ruminantes concluíram que a forma aglicona é mais biodisponível que a glicosilada em humanos, ratos e coelhos (Cermak et al., 2003; Erlund et al., 2004; Manach et al., 1997). Para ruminantes, no entanto, a biodisponibilidade da forma glicosilada é muito superior à aglicona, sugerindo que a presença do açúcar ligado ao flavonoide tem algum efeito protetor contra a degradação microbiana no rúmen (Berger et al., 2012).

Ainda com relação à absorção destes compostos, Murota & Terao (2003), num estudo a respeito da ingestão e biodisponibilidade dos polifenóis em humanos,

afirmaram que a maior parte deles não é encontrada na urina. Isso sugere que estes componentes dietéticos podem seguir três caminhos distintos: não foram absorvidos pelas células do epitélio intestinal, foram absorvidos e excretados na bile ou metabolizados pela microflora intestinal ou pelos tecidos.

Baseados nos resultados de inúmeros estudos a respeito da biodisponibilidade dos polifenóis, Manach et al. (2005) concluíram que esta característica varia grandemente entre os polifenóis, e que o polifenol mais abundante na dieta não é necessariamente aquele encontrado em maiores concentrações nos tecidos alvo, uma vez que os metabólitos presentes no sangue, resultado da digestão e atividade hepática, usualmente diferem dos componentes originais. Estes autores também verificaram diferença com relação à cinética observada entre as diferentes classes de polifenóis, sendo que a concentração plasmática máxima variou de 1,5 a 5,5 horas, e atribuíram estas variações ao local de absorção intestinal.

Citando pesquisas da década de 1990, Scalbert & Williamson (2000) afirmaram com base nos resultados destes estudos, que a concentração de flavonoides intactos no plasma humano raramente excede 1mM e que a concentração máxima é alcançada 1 a 2 horas após a ingestão. Porém, este tempo pode ser maior para alguns polifenóis que são absorvidos somente após degradação parcial pela microflora do cólon. A máxima concentração plasmática de flavonols em vacas leiteiras foi detectada 42 minutos após a administração ruminal de 50 mg/kg de peso vivo de rutina, forma glicosilada da quercetina, e a biodisponibilidade absoluta calculada para ruminantes foi de 0,1% nesta dose (Berger et al. 2012).

Com base nestas informações é possível, no caso dos ruminantes, que o metabolismo dos compostos fenólicos seja ainda mais intenso se considerar o longo período de exposição destes componentes da dieta à imensa diversidade de microrganismos que atuam no mecanismo fermentativo do rúmen. É provável que ocorram sucessivas reações de hidrólise com conversão das formas glicosiladas para aglicona e, que a ação bacteriana no rúmen converta grande parte dos flavonoides da dieta em metabólitos secundários, que podem ou não ser absorvidos no intestino. Da mesma forma, os compostos gerados a partir do metabolismo ruminal dos flavonoides podem resultar em componentes secundários mais ou menos ativos que aqueles que lhes deram origem.

2.2 - Atividade antibacteriana

Muitos estudos são realizados com o intuito de avaliar o efeito antibacteriano de apenas um dos constituintes isolados da própolis. Porém, nem sempre esta é a melhor estratégia para realização de estudos envolvendo os flavonoides, pois não são raros os relatos da ocorrência de sinergismo entre as inúmeras substâncias encontradas na própolis quando se trata da sua ação antimicrobiana. Ainda assim, tanto os estudos que avaliam o efeito isolado de um determinado composto quanto os que utilizam extratos de própolis, identificam grandes variações nos resultados. Sforcin (2007) alerta que diferentes métodos de extração influenciam os efeitos relacionados à atividade da própolis, uma vez que diferentes solventes solubilizam e extraem diferentes compostos.

Em ampla revisão de literatura a respeito das propriedades antibacterianas dos flavonoides Cushnie & Lamb (2005) relataram que existe uma relação bastante forte entre a característica estrutural e a atividade antibacteriana apresentada pelos flavonoides. De acordo com os dados revisados pelos autores, apesar do efeito antibacteriano ser potencializado pela ligação de alguns grupamentos químicos, a presença de grupamentos hidroxila em determinadas posições parece ser a mais importante em conferir maior poder antibacteriano aos compostos fenólicos. Por outro lado, a metoxilação pode ser responsável pelo decréscimo da atividade. No entanto, é importante ressaltar que alterações estruturais e seu efeito sobre a atividade antibacteriana são específicos para cada tipo de flavonoide.

Dentre os vários componentes da própolis com atividade antimicrobiana destacam-se os flavonoides apigenina, galangina, pinocembrina, naringina, naringenina, quercetina e seus glicosídeos e kaempferol. Em sua revisão a respeito da atividade biológica da própolis e seus extratos, Khalil (2006) afirma que muitos pesquisadores investigaram sua atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e verificaram atividade antibacteriana para uma grande variedade de bactérias Gram-positivas, mas atividade limitada contra Gram-negativa.

Mirzoeva et al. (1997) avaliaram a ação antimicrobiana da própolis e alguns de seus componentes sobre o crescimento, potencial de membrana e mobilidade de bactérias e concluíram que os constituintes da própolis aumentam a permeabilidade da membrana e inibem a motilidade das bactérias. Este efeito foi verificado tanto sobre microrganismos Gram-positivos como Gram-negativos. Mais recentemente, Cushnie & Lamb (2011) revisaram dados de literatura e sugeriram que a atividade antimicrobiana

pode ser atribuída aos danos causados à membrana citoplasmática em razão da perfuração ou redução da fluidez da membrana, inibição da síntese de ácidos nucleicos, causada pela inibição da enzima topoisomerase, e interferência no metabolismo energético, causada pela inibição da NADH-citocromo redutase.

Muitas propostas a respeito do mecanismo de ação da própolis e seus constituintes foram apresentadas ao longo dos anos. No entanto, este assunto ainda gera incertezas entre pesquisadores de modo que muitos trabalhos são realizados na tentativa de elucidar tais dúvidas.

2.3 - Atividade antioxidante

Acredita-se que várias atividades farmacológicas da própolis sejam atribuídas a seus compostos fenólicos (Cigut et al., 2011). Os polifenóis são os mais abundantes antioxidantes encontrados na dieta e sua importância está diretamente relacionada à sua natureza química. Juntamente com outros componentes da dieta como vitamina C, vitamina E e carotenoides, são agentes redutores e protegem os tecidos do corpo contra o estresse oxidativo. Por essa razão são comumente chamados de antioxidantes, e atuam na prevenção do organismo contra doenças associadas ao estresse como câncer, doenças cardiovasculares, inflamações e outras (Scalbert & Williamson, 2000).

Esta família de compostos é assunto de muitas pesquisas com foco no estudo de substâncias com atividade antioxidante, sendo esta ação dependente da estrutura química, do posicionamento dos grupos substituintes e do grau de hidroxilação (Cushnie & Lamb, 2005).

A estrutura química dos polifenóis já é conhecida a bastante tempo, de modo que Havsteen (1983), já afirmava que os polifenóis contêm em sua estrutura química número variável de grupos hidroxila que lhes confere grande capacidade antioxidante, como as destacadas por Saskia et al. (1996), que evidenciaram a habilidade de se unirem a polímeros biológicos, tais como enzimas, transportadores de hormônios e DNA; a excelente propriedade de quelar íons metálicos como Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} , catalisar o transporte de elétrons e oxidar radicais livres.

De acordo com Cigut et al. (2011) a maior parte dos estudos para avaliação da atividade antioxidante da própolis foi realizada *in vitro*, porém, com base nestes estudos, não se pode assumir que os compostos antioxidantes presentes em várias substâncias bioativas expressarão as mesmas atividades em nível celular. Porém, Pietta

(2000) afirma que a atividade antioxidante dos flavonoides pode ser evidenciada *in vivo* pelo aumento da capacidade antioxidante do plasma, pelo efeito poupador de lipoproteínas de baixa densidade e vitamina E, além da preservação de AG poli-insaturados na membrana dos eritrócitos.

Ao revisar o papel dos flavonoides como antioxidantes, Pietta (2000) propõe uma série de mecanismos de ação que incluem a redução da formação de espécies reativas do oxigênio pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); quelação de íons metálicos que podem iniciar a produção de radicais hidroxil; sequestro de radicais livres; indução de enzimas como glutathione transferase, que aumenta a excreção de espécies oxidadas, ou indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína, que é uma proteína queladora de metais com propriedades antioxidantes.

Num estudo a respeito das propriedades químicas, metabolismo e a relação entre a estrutura e atividade dos flavonoides, Heim et al. (2002) alertaram que embora os flavonoides apresentem propriedades antioxidantes importantes, podem também apresentar comportamento pró-oxidante. A alegação é embasada em relatos de mutagenicidade baseada no dano oxidativo causado pelos flavonoides, e mais uma vez, a estrutura química do composto tem relação direta com a expressão deste comportamento.

A atividade pró-oxidante dos flavonoides parece ser diretamente proporcional ao número total de grupos hidroxila ligados a seus anéis, pois Hanasaki et al. (1994) verificaram que uma série de mono e dihidroxiflavonoides não possuíam atividade pró-oxidante detectável, enquanto múltiplos grupos hidroxila, especialmente presentes no anel B, aumentaram significativamente a produção de radicais hidroxil. Esse comportamento pró-oxidante é responsável pelos efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos dos flavonoides isolados de várias ervas medicinais (Ueda et al., 2002). Essas informações sugerem que o mesmo atributo estrutural que aumenta a capacidade antioxidante pode também potencializar o estresse oxidativo e os danos funcional e estrutural das moléculas celulares (Behling et al., 2004).

2.4 - Oxidação lipídica

Todos os organismos aeróbios necessitam de oxigênio molecular como aceitador de elétrons para a produção eficiente de energia. No entanto, o uso do oxigênio durante

o metabolismo energético leva a formação de uma variedade de radicais livres, que de acordo com a literatura (Erenel et al., 1993; Rice-Evans & Burdon, 1993), incluem espécies reativas do oxigênio (íon superóxido, hidroxila, peróxido de hidrogênio, alcoxila, peroxila, peridroxila e oxigênio singlete), complexos de metais de transição ($\text{Fe}^{+3}/\text{Fe}^{+2}$, $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+}$), radicais de carbono (triclorometil), radicais de enxofre (tiol) e radicais de nitrogênio (fenildiazina e óxido nítrico).

Os principais alvos biológicos dos radicais livres e das espécies reativas ao oxigênio (EROs) são as proteínas, cuja oxidação conduz à perda de função ou à degradação prematura nos proteossomas; os lipídios, cuja oxidação altera as propriedades físicas das membranas celulares e, conseqüentemente, a sua função; e o DNA, cuja oxidação pode conduzir a mutações gênicas, a síntese proteica anormal, a alteração na expressão gênica, a apoptose e à morte celular. Assim, a oxidação lipídica representa um problema em relação à manutenção da integridade dos tecidos corporais e conseqüentemente da saúde, e também no que diz respeito à preservação das características dos alimentos, principalmente aqueles enriquecidos com perfil de AG poli-insaturados benéficos para a saúde. Afinal, o valor nutricional e as propriedades organolépticas dos alimentos são afetados por reações que levam à modificações das estruturas dos lipídios incluídos em sua composição (Donnelly & Robinson, 1995).

Nos sistemas biológicos a oxidação ocorre basicamente em função da presença de radicais livres. Estas moléculas são extremamente reativas porque possuem um elétron isolado que pode se ligar a qualquer outro elétron disponível. Ácidos graxos insaturados são estruturas instáveis e, portanto, mais suscetíveis ao processo oxidativo (Timmons et al., 2001), havendo dependência direta entre o grau de insaturação e a susceptibilidade à oxidação. Assim, pode-se dizer que os radicais livres são capazes de causar alterações nos AG poli-insaturados das membranas celulares e diretamente sobre alguns componentes celulares, pois são os responsáveis pela iniciação das reações de peroxidação lipídica.

Ao abordar a ação antioxidante dos flavonoides em sua revisão a respeito das propriedades destes compostos, Martínez-Flórez et al. (2002) citam trabalhos que comprovam a eficiência dos flavonoides em eliminar processos de peroxidação do ácido linoleico e dos fosfolipídios de membrana, além de sua potente capacidade de inibir *in vitro* a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

Além da atividade antioxidante relacionada com a propriedade sequestrante de radicais livres, Sadik et al. (2003) afirmam que os flavonoides são bons inibidores das

lipoxigenases, metaloenzimas com um átomo de ferro em seu centro ativo, que catalisam a oxidação de AG poli-insaturados para formar peróxidos. Em função de sua estrutura química o ácido linoleico encontrado em grande quantidade no óleo de soja, é um dos substratos preferidos destas enzimas. Deste modo, o consumo de flavonoides pode representar uma forma interessante de assegurar a integridade dos lipídios poli-insaturados presentes nas dietas de ruminantes, principalmente aquelas enriquecidas com fontes de óleos contendo grandes quantidades destes AG.

3 – Própolis e compostos fenólicos na produção de ruminantes

A utilização da própolis como aditivo nutricional para ruminantes é fundamentada basicamente em sua ação antimicrobiana, atribuída principalmente ao grande número de compostos fenólicos presentes em sua composição e, que por mecanismos de ação ainda não muito bem esclarecidos, atuam de forma seletiva sobre o crescimento de determinados grupos de microrganismos. Dentre todas as propriedades biológicas atribuídas à própolis, a ação antimicrobiana é certamente a mais estudada, no entanto, muitos estudos realizados em diversas áreas de pesquisa têm também evidenciado o potencial de uso dos constituintes da própolis como agentes antioxidantes.

Os aditivos nutricionais são incluídos às dietas, entre outras finalidades, para eliminar o crescimento de microrganismos indesejados e/ou selecionar aqueles cujos produtos finais da fermentação são benéficos para os ruminantes. Alterações nos padrões de fermentação ruminal com controle seletivo de bactérias levam ao redirecionamento do fluxo de carbono, limitando as perdas decorrentes da formação de compostos secundários como metano, amônia e calor que representam perdas dos nutrientes da dieta (Santos, 2011).

Pesquisas para avaliar as propriedades da própolis incluem produtos oriundos de diferentes regiões, extraídos a partir da utilização de diversos solventes, testados na forma bruta ou processada, e avaliados em protocolos que incluem estudos *in vivo* e *in vitro*. Em revisão a respeito do potencial da própolis para o desenvolvimento de novas drogas, Sforcin & Bankova (2011) verificaram que em estudos *in vitro*, a própolis pode agir diretamente sobre microrganismos e *in vivo*, estimula o sistema imune e ativa mecanismos envolvidos na eliminação de microrganismos. Ainda neste estudo, os autores reforçam a necessidade de uma abordagem mais ampla a respeito da relação entre a composição química do produto avaliado, suas fontes botânicas e os efeitos

observados, já que a padronização universal da própolis parece ser impossível (Bankova, 2005).

Comparativamente a outros aditivos, os estudos a respeito do uso da própolis na produção de ruminantes ainda são bastante limitados. No entanto, seus efeitos positivos sobre a diminuição na produção de gases, amônia e alterações na produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) já foram demonstrados *in vitro* e *in vivo*. Aditivos antimicrobianos como a própolis podem ser alternativas eficientes para reduzir a perda de nitrogênio pelos ruminantes (Barbosa et al., 2001), já que a amônia é produzida basicamente a partir do excesso de nitrogênio oriundo da ação de enzimas microbianas sobre aminoácidos e peptídeos liberados de fontes de proteína solúvel da dieta (Oliveira et al., 2004).

Estudos realizados por Stradiotti Júnior et al., (2004ab) com o intuito de avaliar a desaminação de aminoácidos e a fermentação de alimentos pela técnica de produção de gases, revelaram que a própolis foi eficiente em inibir a atividade de desaminação de aminoácidos pelos microrganismos ruminais tanto *in vitro* como *in vivo*. Ainda de acordo com dados destes autores, a própolis inibiu a produção de gases *in vitro* pelos microrganismos ruminais e possibilitou aumento da taxa de digestão específica dos carboidratos. Embora não tenha alterado a proporcionalidade entre os AGCC, a própolis aumentou a concentração total dos mesmos, o que em linhas gerais, confere aos ruminantes maior possibilidade de se manterem e produzirem a partir de uma mesma dieta.

Pesquisas semelhantes conduzidas por Oliveira et al. (2004 e 2006) para avaliar o efeito da própolis sobre a degradabilidade da proteína de diferentes fontes de nitrogênio e sobre a fermentação de aminoácidos *in vitro*, também atestaram o efeito positivo da própolis na redução da produção de amônia. No estudo a respeito da fermentação de aminoácidos, os pesquisadores ainda ressaltam o efeito bactericida da própolis em relação à ação bacteriostática apresentada pela monensina.

Os resultados apresentados por estes estudos permitem afirmar que a própolis apresenta potencial para ser utilizada como aditivo nutricional visando melhorar a eficiência de utilização da proteína dietética, levando a redução na produção de amônia e conseqüente diminuição da perda de nitrogênio. Isto se deve ao comportamento ionóforo apresentado por alguns dos componentes da própolis, que de acordo com Mirzoeva et al. (1997), apresentam efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana,

modificação do status bioenergético e inibição de sua motilidade. Por esta razão, Oliveira et al. (2004) afirmam que a própolis atua sobre a inibição de bactérias Gram-positivas, sendo esperado que sua adição em cultivo de microrganismos ruminais iniba o crescimento de bactérias proteolíticas da mesma forma que os ionóforos.

Os efeitos do óleo de soja associado ou não ao extrato etanólico de própolis na dieta de cabras em lactação foram avaliados por Lana et al. (2005) que também compararam os efeitos de níveis crescentes de inclusão de óleo, extrato etanólicos de própolis e própolis bruta (Lana et al., 2007) à dieta de cabras secas, sobre o consumo, digestibilidade dos nutrientes, parâmetros de fermentação ruminal, produção e composição do leite. Os autores verificaram que para cabras em lactação a associação do óleo de soja com própolis reduziu os consumos de matéria seca e de fibra em detergente neutro, aumentou os teores de gordura, proteína e sólidos totais no leite, aumentou o pH e reduziu a relação acetato:propionato no líquido ruminal. Já para as cabras secas a inclusão dos aditivos óleo de soja, extrato etanólico de própolis e própolis bruta moída, ou a interação aditivo \times nível de inclusão, não teve efeito sobre o consumo de matéria seca e de nutrientes, nem alterou os parâmetros de fermentação ruminal. Stelzer et al. (2009) avaliou o desempenho de vacas leiteiras consumindo dois níveis de concentrado associados ou não ao extrato etanólico de própolis e concluiu que o extrato de própolis preparado a 30% p/v, não altera o consumo, digestibilidade e desempenho de vacas com produção superior a 20 kg de leite/dia. Segundo os autores, a falta de resultado pode ser atribuída à quantidade e forma inadequadas para o fornecimento do produto.

O efeito antioxidante resultante da associação entre compostos polifenólicos extraídos de plantas e a vitamina E sobre a redução da lipoperoxidação no plasma foi pesquisado por Gobert et al. (2009) em vacas suplementadas com AG poli-insaturados. Os resultados mostraram que a associação destas fontes antioxidantes foi eficiente em reduzir a peroxidação lipídica de vacas no meio da lactação recebendo dietas enriquecidas com óleo de linhaça, ajudando a protegê-las contra os efeitos deletérios da lipoperoxidação e a garantir o valor nutricional dos produtos lácteos enriquecidos com ômega 3. Yeum et al. (2004) afirmam que esse efeito pode ser resultante da complementariedade entre as ações decorrentes das propriedades hidrofílicas observadas para os polifenóis e as lipofílicas da vitamina E em diferentes pontos das células.

Gobert et al. (2009) não relatam em seu estudo a composição do extrato utilizado em relação aos compostos com atividade biológica de interesse zootécnico. Esta é uma crítica comum aos estudos envolvendo também os extratos de própolis, já que não é possível comparar os elementos presentes no composto testado e os efeitos verificados nas variáveis estudadas.

Estes dados sugerem que apesar da possibilidade do uso da própolis como aditivo alimentar para manipulação dos parâmetros de fermentação ruminal e, possivelmente a composição do leite, ainda existem variações quanto aos resultados verificados. Isto indica a necessidade da realização de mais pesquisas envolvendo a inclusão de própolis na dieta de ruminantes. Ainda, é necessário investir na tentativa de padronizar um produto com composição regular, estável, de fácil aplicação e que incluído às dietas de ruminantes na dose adequada possa expressar seu efeito de modo regular e contínuo.

Como mencionado, as propriedades antimicrobiana e antioxidante da própolis são baseadas principalmente na ação dos compostos fenólicos, mais especificamente os flavonoides. Estes compostos podem ser importantes ferramentas para prevenir ou evitar o processo de peroxidação lipídica, comum para os metabólitos de dietas ricas em AG, especialmente os poli-insaturados, que apesar de melhorarem o valor nutricional dos produtos dos ruminantes, também aumentam o risco da lipoperoxidação no plasma e nos tecidos.

4 – Estudos com produto à base de própolis na Universidade Estadual de Maringá

A aplicação da própolis como aditivo nutricional para ruminantes vem sendo estudada por uma equipe de trabalho que envolve professores e alunos dos Departamentos de Zootecnia, Farmácia e Química da Universidade Estadual de Maringá. A princípio foram formulados 12 produtos a partir da combinação de quatro concentrações de própolis, chamadas A, B, C e D, e três soluções hidroalcoólicas, identificadas como 1, 2 e 3 (Figura 2). Os produtos finais estão sob o pedido de registro no Instituto Nacional de Propriedade Industrial com número 605768-3.

Inicialmente, a ação antimicrobiana dos compostos fenólicos presentes em diferentes concentrações nos 12 extratos secos foi avaliada em estudos *in vitro*, usando a monensina sódica como controle positivo em dietas com diferentes relações volumoso:concentrado. Estas avaliações mostraram que os produtos com concentração

de própolis B e C, contendo teor médio de flavonoides totais medidos em crisina, foram os que apresentaram os melhores resultados (Prado et al., 2010d). Com base nestes resultados, os produtos que combinaram as melhores condições de extração e resultados satisfatórios em comparação à monensina foram submetidos a uma série de avaliações com diferentes metodologias experimentais e espécies de ruminantes.

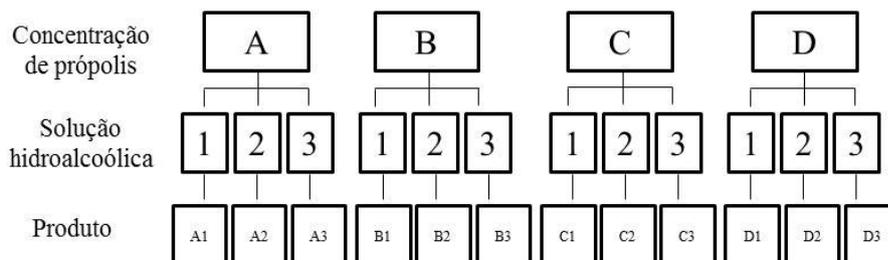


Figura 2 – Distribuição esquemática das combinações entre a concentração de própolis e a solução hidroalcoólica para elaboração dos extratos secos.

Alguns dos extratos secos de própolis dos grupos B e C demonstraram capacidade seletiva sobre as bactérias ruminais e selecionaram diferentes cepas dependendo do produto utilizado e do tipo de dieta testada (Prado et al., 2010b) de modo que o produto à base de própolis C1, com a maior concentração de flavonoides e ácidos fenólicos apresentou resultados semelhantes à monensina quanto aos efeitos sobre processos digestivos, produção de AGCC, produção microbiana e cinética ruminal (Simioni, 2011). A adição de extrato seco de própolis dos grupos B e C em dietas à base de forragem teve efeito negativo sobre a digestão dos nutrientes para bovinos em crescimento (Prado et al., 2010a), proporcionaram maior concentração de energia digestível para bubalinos (Prado et al., 2010c) e permitiram maior fluxo de proteína para o intestino das duas espécies. Estes resultados indicaram a possibilidade de extratos secos dos grupos B e C serem utilizados como aditivos antimicrobianos e deixaram clara a necessidade do estabelecimento de dosagens específicas para cada espécie.

Neste sentido, a adição de duas doses de um extrato seco de própolis do tipo C1 na dieta de bovinos em confinamento foi avaliada com o objetivo de determinar seus efeitos sobre o consumo de matéria seca, ganho de peso, conversão alimentar, digestibilidade e eficiência de síntese de proteína microbiana. As quantidades testadas não influenciaram desempenho, a digestibilidade total ou as características de carcaça de bovinos confinados na fase de terminação (Aguilar, 2009). No entanto, uma dose

mais elevada deste mesmo extrato aumentou o ganho de peso e melhorou a conversão alimentar de bovinos em confinamento (Zawadzki et al., 2011), indicando relação entre a dose administrada e o efeito observado.

Na tentativa de estabelecer uma curva dose resposta ao uso dos aditivos à base de própolis na dieta de bovinos em confinamento, Simioni (2011) verificou que o aumento nas doses do produto à base de própolis do tipo C1, interferiram no desempenho animal e eficiência alimentar, sendo este resultado positivo atribuído ao aumento de três vezes a dose inicial do produto e negativo com o aumento de quatro vezes a dose inicial. Contudo, as diferentes doses não alteraram o consumo alimentar, a digestibilidade aparente dos nutrientes, produção microbiana e as concentrações sanguíneas de glicose, ureia e imunoglobulina G.

Ainda neste estudo, Simioni (2011) determinou que o produto à base de própolis utilizado, pouco interferiu nas características da carcaça e na composição química e lipídica do músculo *Longissimus dorsi*. Porém, quando interferiu foi de forma positiva, aumentando os AG insaturados. Além disso, foi capaz de manter a coloração da carne armazenada sob refrigeração, permanecendo mais atraente para os consumidores. Este resultado indicou a possibilidade do uso dos produtos à base de própolis também como fonte de compostos com ação antioxidante, capazes de melhorar a qualidade dos produtos de origem animal.

A presença dos compostos com ação antioxidante nos extratos secos de própolis foi comprovada por Cottica et al. (2011), que verificaram relação entre as condições de extração aplicadas para elaboração dos produtos, a concentração de compostos fenólicos e flavonoides e a ação antioxidante dos extratos. Além da ação antimicrobiana, os produtos que mostraram maior atividade antioxidante, novamente grupos B e C, foram testados como aditivos em dietas de vacas leiteiras para melhorar a estabilidade oxidativa do leite.

Os produtos à base de própolis interferiram no metabolismo ruminal e reduziram a perda de nitrogênio na forma de amônia. Não afetaram a produção e qualidade do leite, mas alteraram a composição em AG e aumentaram a capacidade antioxidante do leite, que foi positivamente correlacionada com a quantidade de compostos fenólicos do produto avaliado (Aguiar, 2012).

Estes resultados evidenciam o potencial da própolis como aditivo antimicrobiano e antioxidante para bovinos de corte e leite. No entanto, as variações observadas nas respostas ao uso destes produtos, tanto no que diz respeito aos parâmetros de

digestibilidade dos nutrientes como na transferência de compostos fenólicos para o leite, ainda deixam dúvidas a respeito da dose necessária para obtenção de respostas positivas e de maneira contínua, especialmente para vacas leiteiras em que o número de informações é bastante restrito. Parte das dúvidas relacionadas aos resultados decorrentes do uso da própolis como aditivo em dietas de bovinos se deve ao desconhecimento do seu modo e local de atuação. Portanto, fica evidente a necessidade de esclarecer o papel dos compostos bioativos da própolis no ambiente ruminal e seu potencial de ação sobre a microbiota rúmen.

Referências

- AGUIAR, S.C. **Produtos à base de própolis (LLOS) na dieta de bovinos inteiros confinados: desempenho, digestibilidade total, eficiência de síntese microbiana e características de carcaça**. 2009. 58f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- AGUIAR, S.C. **Quantificação e caracterização dos compostos ativos da própolis e seus efeitos sobre a nutrição e qualidade do leite de vacas e cepas bacterianas do rúmen**. 2012. 132f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.
- BARBOSA, N.G.S.; LANA, R.P.; MÂNCIO, A.B. et al. Fermentação da proteína de seis alimentos por microrganismos ruminais, incubados puros ou com monensina ou Rumensin. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, p.1316-1323, 2001.
- BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D. C. et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v.15, n.3, p.285–292, 2004.
- BERGER, L.M.; WEIN, S.; BLANK, R. et al. Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5047–5055, 2012.
- 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.
- CERMAK, R.; LANDGRAF, S.; WOLFFRAM S. The bioavailability of quercetin in pigs depends on the glycoside moiety and on dietary factors. **Journal of Nutrition**, v.133, p.2802–2807, 2003.
- CIGUT, T.; POLAK, T.; GASPERLIN, L. et al. Antioxidative Activity of Propolis Extract in Yeast Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.11449–11455, 2011.
- COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v.106, n.3, p.290–302, 2006.
- COTTICA, S.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N. et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.5, p.929-935, 2011.
- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.38, n.2, p.99–107, 2011.
- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, n.5, p.343–356, 2005.
- DONNELLY, J.K.; ROBINSON, D.S. Invited review. Free radical in foods. **Free Radical Research**, v.22, n.2, p.147-176, 1995.
- DRAGO L.; DE VECCHI, E.; NICOLA, L. et al. In vitro antimicrobial activity of a novel propolis formulation (Actichelated propolis). **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n.5, p.1914-1921, 2007.
- ERENEL, G.; ERBAS, D.; ARICIOGLU, A. Free radicals and antioxidant systems. **Materia Medica Polona**, v.1, n.85, p.37-43, 1993.

- ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutrition of Research**, v.24, p.851–874, 2004.
- FRANCHI, G. C., MORAES, C. S., TORETI, V. C. et al. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, p.1–6, 2012.
- GEKKER, G.; HU, S.; SPIVAK, M. et al. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4 + lymphocyte and microglial cell cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.158–163, 2005.
- GHISALBERTI, E.L. Propolis: A Review. **Bee World**, v.60, n.2, p.59-84, 1979.
- GOBERT, M.; MARTIN, B.; FERLAY, A. et al. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.92, n.12, p.6095–104, 2009.
- GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W. Antibacterial properties of propolis (bee glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v.83, p.159–160, 1990.
- HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI S. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.16, p.845–850, 1994.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids. A class of natural products of high pharmacological potency. **Biochem Pharmacol**, v.32, p.1141-1148, 1983,
- HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n.10, p.572–584, 2002.
- HORST, M.A.; LAJOLO, F.M. . Biodisponibilidade de Compostos Bioativos. In: COZZOLINO, S.M.F. (Org.). **Biodisponibilidade de Nutrientes**. 3.ed. Barueri: Manole, 2008, p.772-807.
- KHALIL, M.L. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, n.1, p.22–31, 2006.
- KIMOTO, T.; KOYA-MIYATA, S.; HINO, K., et al. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. **Virchows Archiv**, v.438, n.3, p.259–270, 2001.
- KING, R.D.A.; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**1, v.99, n.2, p.213–218, 1991.
- KUO, H.; KUO, W.; LEE, Y. et al. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on the growth of C6 glioma cells in vitro and in vivo. **Cancer Letters**, v.234, p.199–208, 2006.
- LANA, R.D.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.
- LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; RODRIGUES, M.T. et al. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras : consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.191–197, 2007.
- LEE, S.; KIM, K.S.; PARK, Y. et al. In vivo anti-oxidant activities of tectochrysin. **Archives of Pharmacal Research**, v.26, n.1, p.43–46, 2003.
- LIMA, M.G. **A produção de própolis no Brasil**. 1.ed. São João da Boa Vista: São Sebastião Editora e Gráfica Ltda, 2006.120 pp.

- MANACH, C.; MORAND C.; DEMIGNE, C. et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **FEBS Letters**, v.409, p.12–16, 1997.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, n.1 (Supl.), p.230–242, 2005.
- MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J.M. et al. Los flavonoides : propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, v.17, p.271–278, 2002.
- 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.
- MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.417, n.1, p.12–17, 2003.
- 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 ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.275–281, 2006.
- 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.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p.1035–42, 2000.
- PIETTA, P.G.; GARDANA, C.; PIETTA, A. M. Analytical methods for quality control of propolis. **Fitoterapia**, v.73, n.1(Supl), p.7–20, 2002.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Digestibilidade e parâmetros ruminantes de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1336–1345, 2010a.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; PONTARA, L.P.M. et al. Isolation and expeditious morphological, biochemical and kinetic characterization of propolis-tolerant ruminal bacteria. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2048–2054, 2010b.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminantes em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2055–2065, 2010c.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; PONTARA, L.P.M. et al. Adição de própolis ou monensina sódica sobre digestibilidade *in vitro* da matéria seca. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**, v.11, n.4, p.1023-1032, 2010d.
- RICE-EVANS, C., BURDON, R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. **Progress in Lipid Research**, v.32, n.1, p.71-110, 1993.
- SADIK, C.D.; SIES, H.; SCHEWE, T. Inhibition of 15-lipoxygenases by flavonoids: structure-activity relations and mode of action. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, p.773-781, 2003.
- SANTOS, F.A.; BASTOS, E.M.A.; UZEDA, M. et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.1–7, 2002.
- SANTOS, J.E.P. Distúrbios metabólicos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Ed) **Nutrição de ruminantes**. 2.ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 439-516.

- SASKIA, A.B.E.V. A.; BERG, D.J.V.D.; TROMP, M.N.J.L. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology & Medicin**, v.20, n.3, p.331–342, 1996.
- SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.2073–2085, 2000.
- 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.
- SFORCIN, J.M. Propolis and the immune system: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v.113, n.1, p.1–14, 2007
- SFORCIN, J.M.; ORSI, R.O.; BANKOVA, V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.301–305, 2005.
- SIMIONI, F.L. **Própolis como aditivo alimentar para bovinos de corte**. 2011. 91f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- SONG, Y. S., PARK, E. H., HUR, G. M. et al. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.80, p.155–161, 2002.
- STELZER, F.S.; LANA, R.D.P.; CAMPOS, M.J.D.S. et al. Desempenho de vacas leiteiras recebendo concentrado em diferentes níveis, associado ou não a própolis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1381–1389, 2009.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.D.P. et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **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.
- TIMMONS, J.S.; WEISS, W.P.; PALMQUIST, D.L.; HARPER, W.J. Relationships Among Dietary Roasted Soybeans, Milk Components, and Spontaneous Oxidized Flavor of Milk. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.2440–2449, 2001.
- UEDA, S.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H. et al. Baicalin induces apoptosis via mitochondrial pathway as prooxidant. **Molecular Immunology**. v.38, p.781–791, 2002.
- YEUM, K.J.; RUSSELL, R.M.; KRINSKY, N.I. et al. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.4, n.30, p.97–103, 2004.
- ZAWADZKI, F.; PRADO, I.N.; MARQUES, J.A. et al. Sodium monensin or propolis extract in the diets of feedlot-finished bulls: effects on animal performance and carcass characteristics. **Journal of Animal and Feed Science**, v.20, n.1, p.16–25. 2011.

OBJETIVOS GERAIS

- 1) Determinar a dose de compostos fenólicos capaz de agir sobre a microbiota ruminal e verificar os efeitos sobre as condições de fermentação no rúmen em dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados;
- 2) Avaliar os efeitos da adição de doses de produtos à base de própolis sobre a digestibilidade, parâmetros ruminais e sanguíneos e eficiência de síntese microbiana ruminal quando adicionados às dietas de vacas leiteiras contendo óleo de soja como fonte de ácidos graxos poli-insaturados;
- 3) Avaliar os efeitos do local de perfusão de um produto à base de própolis e do óleo de soja sobre a digestibilidade dos nutrientes, parâmetros ruminais e sanguíneos de vacas em lactação;
- 4) Determinar o papel do rúmen no metabolismo lipídico e dos compostos fenólicos e suas implicações na composição em ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite.

II - Digestibilidade dos nutrientes, composição em ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas recebendo produto à base de própolis

Resumo - Os efeitos de doses de um produto à base de própolis sobre o consumo de matéria seca, digestibilidade dos nutrientes, produção, composição química e em ácidos graxos (AG), atividade antioxidante e estabilidade oxidativa do leite de vacas foram avaliados neste estudo. Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, múltíparas, com aproximadamente 210 dias de lactação, distribuídas em quadrado Latino 4x4. Foram avaliadas três doses diárias de flavonoides (DDF), distribuídas de acordo com os tratamentos: 1) DDF0 – dieta basal sem adição de própolis; e três doses diárias de flavonoides totais quantificados em apigenina, que representaram os demais tratamentos, 2) DDF37 – 37,82 mg/dia de flavonoides totais, 3) DDF63 – 63,04 mg/dia de flavonoides totais e 4) DDF88 – 88,25 mg/dia de flavonoides totais. Os animais foram confinados e receberam dieta composta por 44,52% de concentrado e 55,48% de volumoso. Houve efeito ($P < 0,05$) da dose de flavonoides para a digestibilidade aparente da proteína, extrato etéreo e para o NDT, que juntamente com a fibra em detergente neutro apresentaram comportamento quadrático ($P < 0,05$) em relação à dose de flavonoides. O consumo do produto à base de própolis não alterou ($P > 0,05$) a composição química do leite, porém, influenciou sua composição em ácidos graxos. Apesar disso, não houve benefício ($P > 0,05$) para a qualidade da gordura do leite por meio da redução dos AG saturados e aumento dos AG mono e poli-insaturados. A atividade antioxidante do leite aumentou linearmente ($P < 0,05$) em relação ao consumo de compostos fenólicos do produto à base de própolis. Doses de 37,82 a 63,04 mg de flavonoides/dia são mais recomendadas para melhorar as características relacionadas à digestibilidade dos nutrientes, enquanto a atividade antioxidante se mostrou dose dependente.

Palavras-chave: aditivo, antimicrobiano, estabilidade oxidativa, flavonoide

Digestibility of nutrients, milk fatty acid profile and antioxidant activity of milk from cows receiving propolis based product

Abstract – The effects of increasing doses of a propolis based product, associated with soybean oil in dairy cows diet, were evaluated on dry matter intake, nutrients digestibility, production, composition and oxidative stability of milk. Four multiparous Holstein cows were used, with approximately 210 days in milk, assigned in a 4x4 Latin square, design according to the following treatments: 1) DDF0 - basal diet without propolis; and three daily doses of total flavonoids quantified in apigenin, as described: 2) DDF37 - 37.82 mg/day of total flavonoids, 3) DDF63 - 63.04 mg/day of total flavonoids and 4) DDF88 - 88.25 mg/day of total flavonoids. The animals were confined in tie-stall system and fed diet composed of 44.52% concentrate and 55.48% silage. The product-based propolis influenced ($P<0.05$) digestibility of protein, fiber and fat, but did not alter ($P>0.05$) milk production and composition. Despite the changes in milk fatty acid composition, propolis does not reduce the saturated fatty acids or increased monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. The use of product-based propolis in dairy cows diets affect the digestibility of nutrients, fatty acid composition and oxidative stability of milk, but does not influence milk production. The consumption of 37 and 63 mg flavonoids/day improved fiber, crude protein and lipids digestibility while the oxidative stability showed dose-dependent.

Keywords: additive, antimicrobial, flavonoid, oxidative digestibility

Introdução

Gorduras e óleos vegetais são fornecidos a vacas leiteiras com o objetivo de aumentar a concentração energética da dieta e a participação de determinados ácidos graxos (AG) na gordura do leite, especialmente os AG poli-insaturados. Aditivos com ação antimicrobiana capazes de manipular a microbiota, melhorar as condições de fermentação ruminal e aumentar a eficiência produtiva dos bovinos também são frequentemente utilizados. Neste sentido, a própolis se mostra uma alternativa viável, pois os compostos com ação antimicrobiana e antioxidante presentes em sua composição, são capazes de interferir nas condições de fermentação ruminal (Prado et al., 2010a) e também melhorar a qualidade do leite (Cottica et al., 2011).

Os flavonoides representam um grupo de compostos fenólicos encontrados na própolis e são considerados potentes inibidores do crescimento de bactérias, mas a intensidade do efeito inibitório mostrou ser variável e dependente da estirpe bacteriana (Basile et al., 1999), bem como da quantidade de flavonoides presentes no produto avaliado (Kumazawa et al., 2004). Shimizu et al. (2004) afirmam que a própolis tem forte atividade antioxidante e atribuem esta propriedade à presença de compostos fenólicos como artepilin C, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, kaempferol, naringenina e crisina, entre outros. Parte destes compostos fenólicos é encontrada na própolis brasileira.

Lipídios são compostos suscetíveis à ação de peroxidação, especialmente aqueles formados por ácidos graxos poli-insaturados (Papas, 1999), pois esta característica os torna instáveis e os pré-dispõe a reações de oxidação em cadeia. Contudo, antioxidantes encontrados naturalmente na composição do leite são capazes de estabilizar os agentes desencadeadores destas reações. Sendo assim, é necessário que o aumento na concentração de AG poli-insaturados na gordura do leite, decorrente da utilização de fontes adicionais de lipídios às dietas, seja acompanhado de aumento na concentração de compostos antioxidantes capazes de preservar as propriedades químicas e nutricionais destes lipídios.

Portanto, o fornecimento simultâneo de própolis e óleo de soja poderia exercer efeito sinérgico sobre a população microbiana do rúmen, melhorar a composição em AG e a concentração de antioxidantes na gordura do leite e resultar em aproveitamento mais eficiente da dieta e leite com melhor valor nutricional.

Neste sentido, objetivou-se avaliar por meio deste estudo os efeitos do aumento da dose de um produto à base de própolis associado ao óleo de soja, sobre o consumo de matéria seca (MS), digestibilidade dos nutrientes, produção, composição química e em ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas.

Material e métodos

- Local

O experimento foi conduzido no setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia, no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia e Farmacologia e no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química, pertencentes à Universidade Estadual de Maringá.

- Animais

Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, multíparas, com peso corporal (PC) médio e desvio padrão de $582 \pm 67,23$ kg, com aproximadamente 210 dias de lactação, ordenhadas duas vezes ao dia às 06h e às 16h e alojadas em baias individuais em sistema *tie stall*.

- Dieta experimental e tratamentos

As vacas foram alimentadas com uma dieta basal (Tabela 1), fornecida às 07h e 16h. A dieta foi formulada para atender as exigências de vacas com 600 kg de peso corporal (PC) e produção de 20 kg de leite/dia com 3,8% de gordura (NRC, 2001) e o consumo ajustado de modo que as sobras representassem 10% do volume consumido.

Os tratamentos avaliados consistiram no fornecimento de três doses diárias de flavonoides totais (DDF) advindas de um produto à base de própolis (PBP) distribuídos da seguinte forma: DDF0 – dieta basal sem adição de própolis; além de três doses diárias de flavonoides totais quantificados em apigenina, que representaram os demais tratamentos: 2) DDF37 – 37,82 mg/dia de flavonoides totais, 3) DDF63 – 63,04 mg/dia de flavonoides totais e 4) DDF88 – 88,25 mg/dia de flavonoides totais. As doses propostas para execução deste projeto foram estabelecidas com base em resultados obtidos em pesquisas anteriores em que uma

dose inicial do produto foi testada para os mesmos parâmetros avaliados neste estudo (Aguiar, 2012).

Tabela 1 – Composição química e em ácidos graxos dos alimentos e proporção dos ingredientes usados nas dietas experimentais

	g/kg ¹								Dieta (%)
	MS	MO	PB	EE	FDN _{CP}	FDA	CHT	CNF	
Silagem milho	276,0	959,7	70,8	25,8	512,1	325,1	863,0	350,9	55,48
Farelo de soja	917,5	936,9	513,9	19,4	122,9	88,9	403,5	280,6	11,35
Milho moído	905,7	988,5	89,6	32,4	127,6	41,8	866,5	739,0	15,03
Farelo de trigo	922,4	954,9	190,1	28,6	343,8	109,5	736,3	392,4	13,35
Óleo de soja	-	-	-	991,3	-	-	-	-	2,23
Supl. Mineral ²	-	-	-	-	-	-	-	-	0,89
Cloreto de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	0,22
Calcário	-	-	-	-	-	-	-	-	0,89
Ureia	-	-	2810,0	-	-	-	-	-	0,56
Dieta	564,4	914,8	152,2	47,5	363,1	211,4	753,1	390,0	100,0

Item	Ácido graxo (mg/g de lipídios totais)						
	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-3	20:0	22:0
Silagem de milho	171,81	29,19	164,65	425,31	53,58	7,19	3,77
Farelo de soja	175,95	41,43	171,69	455,05	42,25	3,52	4,97
Milho moído	141,76	25,55	233,96	464,99	9,14	5,84	2,12
Farelo de trigo	177,20	12,51	122,53	473,48	30,45	1,52	1,56
Óleo de soja	103,00	22,18	272,46	445,28	40,03	3,26	5,11
Dieta total	162,55	26,90	185,07	430,64	40,85	5,54	3,29

¹MS = matéria seca, MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, FDN_{CP} = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, FDA = fibra em detergente ácido, CHT = carboidratos totais, CNF = carboidratos não fibrosos. ²Composição mineral do suplemento (por kg de produto): 180 g de cálcio, 90 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 85 g de sódio, 100 mg de cobalto, 1000 mg de cobre, 1200 mg de manganês, 90 mg de iodo, 36 mg de selênio e 3000 mg de zinco.

- Produto à base de própolis (PBP)

O PBP fornecido às vacas foi preparado de acordo com metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999). A própolis que serviu de matéria-prima para a elaboração do produto foi coletada no apiário da FEI, localizado no interior de uma reserva de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) rodeada de mata nativa e alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). O extrato seco de própolis está registrado no

Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob nº 0605768-3. Sua preparação consiste na extração hidroalcoólica da própolis bruta, a fim de liberar suas substâncias ativas, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos. Subsequentemente, o conteúdo alcoólico é evaporado com o auxílio de um rotaevaporador e seco em *spray dryer*.

Foram administrados diariamente 10 g do PBP contendo as doses diárias de flavonoides totais estabelecidas para cada tratamento (Tabela 2). A quantificação de flavonoides e ácidos fenólicos foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com metodologia descrita por Aguiar (2012) e os principais compostos fenólicos identificados no extrato seco de própolis estão ilustrados na Figura 1.

Tabela 2 – Ingestão diária de flavonoides totais quantificados em apigenina e ácidos fenólicos totais quantificados em ácido p-cumárico do produto à base de própolis

Composto fenólico ¹	Dose diária de flavonoides		
	DDF37	DDF63	DDF88
	(mg/animal/dia)		
Flavonoides totais	37,82	63,04	88,25
Ácidos fenólicos totais ²	16,09	26,81	37,53
Artepillin C e CAPE	4,60	7,60	10,73

¹Quantidade de compostos fenólicos presentes em 10g do produto à base de própolis.²Soma dos ácidos fenólicos agrupados no início do cromatograma com CAPE (éster fenil do ácido cafeico) e Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico).

- Manejo dos animais e período experimental

A administração do PBP e do óleo de soja foi realizada às 07h e 16h. A quantidade diária do PBP foi fornecida em duas porções de 5 g e o volume total diário de óleo foi calculado para representar 2% da dieta, de acordo com o consumo de MS. A quantidade total diária de óleo fornecida foi dividida em duas porções proporcionais ao volume de MS consumido em cada trato. Para garantir a ingestão completa da dose pretendida para os tratamentos, o extrato seco de própolis e o óleo foram fornecidos antes do trato da manhã e da tarde misturados a uma pequena quantidade de concentrado. O restante do trato era disponibilizado somente após a completa ingestão da parte da dieta que continha o tratamento.

O óxido de cromo (Cr_2O_3) foi utilizado como indicador externo para predição do fluxo fecal. Foram utilizados 15g do indicador, divididos em duas doses de 7,5 g. O indicador foi pesado e acondicionado em papel higroscópico e fornecido via sonda esofágica às 07h e 16h do quarto ao décimo sétimo dias de cada período experimental.

O experimento teve duração de 72 dias e foi dividido em quatro períodos experimentais. Cada período experimental teve duração de 18 dias, sendo 14 dias de adaptação aos tratamentos e quatro dias para coleta de dados. A produção de leite foi anotada diariamente para monitorar o desempenho dos animais.

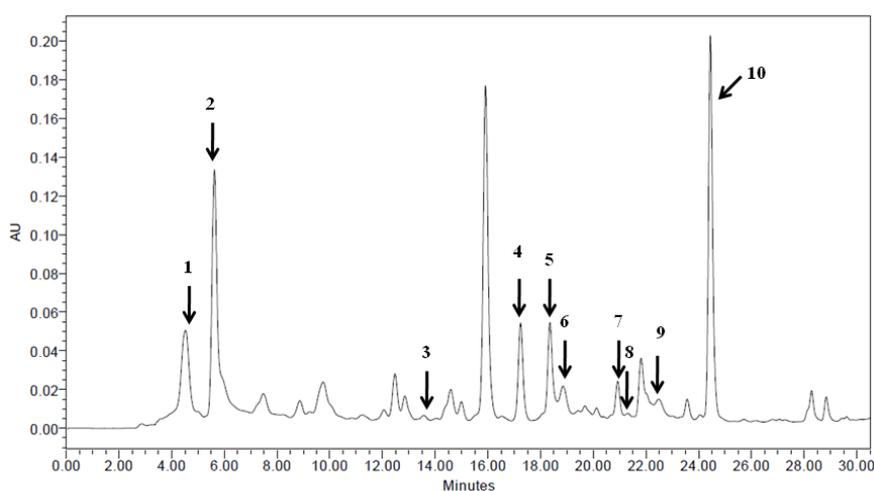


Figura 1 – Compostos fenólicos indentificados no extrato seco de própolis: ácido cafeico (1), ácido p -cumárico (2), naringenina (3), apigenina (4), éster fenil do ácido cafeico (5), pinocembrina (6), crisina (7), galangina (8), acacetina (9) e Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico) (10).

- Coleta e processamento das amostras

Amostras de silagem e concentrado foram coletadas diariamente do décimo quinto ao décimo oitavo dias do período experimental e misturadas para formar uma amostra composta/período. As sobras foram pesadas individualmente, homogeneizadas e amostradas, resultando em uma amostra composta animal/período. Amostras de fezes foram coletadas durante três dias consecutivos, com intervalos de seis horas entre coletas e incremento de duas horas de um dia para o outro para evitar repetições nos horários, totalizando 12 amostras/animal/período. Foram coletados aproximadamente 200 g de amostra por horário. Imediatamente

após a amostragem, o material foi congelado a -20°C para posterior processamento e análise.

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

Para determinar a eficiência de síntese de proteína microbiana foram coletadas amostras *spot* de urina, por micção espontânea, aproximadamente quatro horas após a alimentação. As amostras foram filtradas em papel filtro e uma alíquota de 10 mL de urina foi diluída em 40 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 0,036 N, a fim de evitar destruição bacteriana dos derivados de purina e precipitação do ácido úrico. As amostras de urina foram conservadas em geladeira (5°C) e, analisadas para determinação da concentração de alantoína. Uma segunda alíquota foi coletada, sem diluição com ácido sulfúrico, para determinação da creatinina, ácido úrico e ureia.

Foram colhidas amostras de sangue no 15º dia de cada período experimental, antes da primeira alimentação da manhã por punção da veia mamária, para determinação da ureia, glicose, colesterol total, HDL, LDL e VLDL. O material foi coletado em tubos plásticos tipo vacutainer. Imediatamente após a colheita os tubos foram armazenados em caixa térmica e levados ao laboratório para a realização das análises.

Para a análise da composição química e qualidade do leite, foram coletadas amostras de oito ordenhas consecutivas durante os quatro dias de coleta. As amostras da manhã e da tarde foram misturadas para formar uma amostra composta por animal e por dia, sendo que as alíquotas coletadas foram proporcionais ao volume de leite produzido em cada ordenha diária. Parte do volume amostrado foi mantido em temperatura ambiente e preservada com 2-bromo-2-nitropropano-1,3 diol (BRONOPOL), e encaminhadas para o laboratório da APCBRH (Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa), para determinação dos teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais, ureia e contagem de células somáticas (CCS).

Outras duas amostras de leite foram coletadas e armazenadas a -20°C , sendo uma delas preservada sem adição de conservantes e utilizada para determinação da composição em AG da gordura do leite e a outra acondicionada em frascos plásticos

contendo azida sódica, foi utilizada para determinação da estabilidade oxidativa e concentração de antioxidantes.

- *Análises químicas*

As amostras dos alimentos utilizados na dieta experimental, das sobras e das fezes foram analisadas para teores de matéria seca (MS, método n° 934.01), matéria orgânica (MO, método n° 924.05), proteína bruta (PB, método n° 920.87) e extrato etéreo (EE método n° 920.85) de acordo com AOAC (1990). A fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada segundo Van Soest et al. (1991), sem uso do sulfito de sódio e com inclusão de α -amilase termo resistente. A fibra em detergente ácido (FDA) foi determinada de acordo com método n° 973.18 (AOAC, 1990). A concentração de cromo (Cr) nas amostras de fezes foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica, conforme técnica descrita por Willians et al. (1962). Os carboidratos totais (CT) foram obtidos por meio da equação descrita por Sniffen et al. (1992).

$$CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Matéria\ Mineral)$$

Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram determinados pela diferença entre CT e a FDN corrigida para cinza e proteína (FDN_{CP}). O NDT da dieta experimental foi obtido segundo Weiss (1999):

$$\%NDT = \%PBD + \%FDN_{CPD} + \%CNFD + (\%EED \times 2,25)$$

em que: PBD = proteína bruta digestível, FDN_{CPD} = fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína digestível, CNFD = carboidratos não fibrosos digestíveis, EED = extrato etéreo digestível.

Para determinar a eficiência de síntese de proteína microbiana as amostras de urina foram analisadas para determinação da concentração de alantoína segundo metodologia descrita por Chen & Gomes (1992). Para determinação da creatinina, ácido úrico e ureia foram utilizados *kits* comerciais (Analisa[®]), e as leituras foram feitas em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1601). As análises destas variáveis foram realizadas imediatamente após a coleta das amostras.

A partir da concentração de creatinina nas amostras *spot* de urina, foi estimado o volume urinário, dividindo a excreção diária de creatinina (mg/kg de peso corporal) pela concentração de creatinina (mg/L). Para determinação da excreção diária de creatinina por kg de PC foi adotado o valor médio de 23,41 mg/kg de PC, obtido por Oliveira et al. (2001), que determinaram a excreção de creatinina por

vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas com relação volumoso:concentrado e ingredientes semelhantes às do presente trabalho.

A produção de nitrogênio microbiano (N_{mic}) foi calculada a partir da quantidade de purinas absorvidas (X, mmol/dia), que foi estimada a partir da soma das excreções de derivados de purina (DP) no leite e urina (Y, mmol/dia), por meio da equação descrita por Chen & Gomes (1992):

$$Y = 0,85X + (0,385 PC^{0,75})$$

em que: 0,85 representa a recuperação de purinas absorvidas como DP e 0,385 PC^{0,75} representa a contribuição endógena líquida de DP para a excreção total. Em bovinos leiteiros, a contribuição endógena de derivados de purinas é tomada como uma constante de 0,385 mmol/kg de PC^{0,75} por dia.

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Y, g N/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), por meio da equação também descrita por Chen & Gomes (1992):

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

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

A estimativa de proteína microbiana (PB_{mic}) foi obtida ao se multiplicar a síntese de N microbiano por 6,25, enquanto a eficiência de síntese de proteína microbiana foi determinada como: EP_{mic} (g/kg) = PB_{mic} (g)/CNDT (kg), em que CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais.

A determinação da concentração plasmática da ureia, glicose, colesterol total, HDL, LDL e VLDL foi realizada por meio de *kits* comerciais (Analisa[®]) e as leituras realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1601).

As concentrações de nitrogênio, gordura e lactose no leite foram determinadas por espectrofotometria de infravermelho (Bentley model 2000; Bentley Instrument, Inc., Chaska, MN, USA), seguindo procedimento 972.16 da AOAC (1990). A CCS foi obtida usando contador eletrônico (Somacount 500[®], Chaska, MN, USA), como descrito por Voltolini et al. (2001).

A dosagem dos ésteres metílicos dos AG da gordura do leite e dos alimentos foi realizada a partir da extração dos lipídios totais segundo Folch et al. (1957) e Blich & Dyer (1959), respectivamente. Para transesterificação, o material foi

submetido ao processo de metilação conforme metodologia descrita por Hartman & Lago (1973), modificado por Maia & Rodrigues-Amaya (1993).

Os ésteres de AG foram analisados em cromatógrafo gasoso Thermo Scientific[®] (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), modelo Trace GC Ultra, equipado com injetor automático TriPlus, com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (100 m, 0,25 mm e 0,39 µm od, 100% cianopropil ligado). As vazões dos gases (White Martins, Praxair Technology Inc., USA) foram de 1,4 mL/min para o gás de arraste (H₂), 30 mL/min para o gás auxiliar (N₂), 30 mL/min e 300 mL/min para o H₂ e para o ar sintético da chama, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80.

As temperaturas do injetor e do detector foram 230°C e 240°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 65°C por 4 minutos, seguido pela primeira rampa de 16°C/min até atingir 185°C, permanecendo assim por 12 minutos. A segunda rampa foi programada, de 20°C/min até 235°C, permanecendo nesta temperatura por 9 minutos. O tempo total da análise foi de 35 minutos. As áreas dos picos foram determinadas pelo software ChromQuest, versão 5.0. As injeções foram realizadas em triplicatas e os volumes de injeção foram de 2 µL. A identificação dos AG foi baseada na comparação dos tempos de retenção aos de padrões de ésteres metílicos de AG. A quantificação de CLA e dos ésteres metílicos de AG das amostras foi feita por meio da comparação com tempos de retenção de uma mistura de padrões Sigma-Aldrich[®]. A quantificação (mg de ácido graxo/g de lipídios totais) foi feita usando o éster metílico do ácido tricosanoico como padrão interno (23:0), como descrito por Joseph & Ackman (1992). A concentração dos AG foi obtida por meio da utilização de um fator de correção teórico (Visentainer, 2012) para o detector de ionização de chama (FID). O conteúdo de AG foi calculado pela seguinte equação:

$$FA = \frac{A_X W_{IS} CF_X}{A_{IS} W_X CF_{AE}} \times 100$$

em que, FA é a quantidade de AG em mg/g de lipídios totais, A_X é a área do pico do ácido graxo, A_{IS} é a área do pico do padrão interno (IS) éster metílico do ácido tricosanoico (23:0), W_{IS} é o peso do padrão interno (mg) adicionado a amostra (mg), W_X é o peso da amostra (mg), CF_X é o fator de correção teórico, e CF_{AE} é o fator de correção necessário para expressar os resultados como mg de AG e não como ésteres metílicos.

O conteúdo total de polifenóis foi determinado usando o procedimento de Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton & Rossi (1965) e usando o polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) de acordo com Han et al. (2011). Para a extração dos polifenóis das amostras de leite um mL da amostra foi diluído com 10 mL de metanol (100%). Os extratos foram filtrados com filtro de membrana 0,22 µm PTFE (Spritzen, Shanghai, China) em tubos totalmente protegidos da luz. Após a filtragem, 125 µl da amostra foram misturados com 125 µl da solução de Folin-Ciocalteu (50%, v/v) e 2,25 µl de Na₂CO₃ (3,79 M). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e a leitura realizada a 760 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP2000, Shanghai Spectrum, Shanghai, China).

Os compostos fenólicos foram removidos do soro do leite pela adição de PVPP na concentração de 10 mg/ml. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por três horas, com agitação a cada 30 minutos. Em seguida, foi centrifugada a 15.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado com filtro de membrana 0,22 µm PTFE e as medidas feitas de acordo com o procedimento de Folin-Ciocalteu. A concentração dos compostos fenólicos no soro do leite foi determinada pela diferença da leitura antes e depois do tratamento com PVPP, e os resultados foram expressos como equivalente ácido gálico (EAG; mg/L de leite).

O conteúdo de flavonoides das amostras de leite foi determinado por espectrofotometria, com leitura a 425 nm, após reação com cloreto de alumínio como descrito por Woisky & Salatino (1998) e modificado por Sánchez et al. (2010). Uma alíquota de 100 µl do extrato foi misturada com 50 µl de cloreto de alumínio (5%, v/v) e 850 µl de metanol (90%, v/v). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos antes da leitura. Os resultados foram expressos como equivalente quercetina (EQ; mg/l de leite).

O poder de redução total das amostras de leite foi determinado como descrito por Zhu et al. (2002), com algumas modificações. As proteínas do leite foram precipitadas pela adição de um mL de uma solução 20% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) para um mL de leite. A mistura foi agitada por 10 minutos e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos a 20°C. A absorbância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP2000) e o poder de redução expresso como equivalente ácido gálico (EAG; mg/L de leite).

A análise da capacidade antioxidante pela captura de radicais livres foi realizada pelo método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), que avalia a

capacidade antioxidante da amostra medindo sua habilidade em proteger a fluoresceína da oxidação pelo 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-dicloridrato (AAPH), como descrito por Zulueta et al. (2009), com algumas modificações.

Após descongelamento, as amostras foram homogeneizadas em banho-ultrassom e diluídas em balão volumétrico de 50 mL com tampão fosfato na proporção de 1:1000 (v/v).

Foram adicionados nas microplacas 25 µL das soluções contendo as amostras de leite preparadas anteriormente, ou tampão fosfato como branco ou solução Trolox[®] (ácido(±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), que foi utilizada para compor a curva de calibração. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de fluoresceína a 4,0 nmol/L, preparada a partir da solução estoque (1,0 mmol/L). Após cinco minutos de ambientação das soluções a 37°C sob proteção da luz, foram adicionados 25 µL da solução de AAPH a 160 mmol/L (dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)). Iniciou-se imediatamente a leitura de intensidade da fluorescência, sendo o comprimento de onda de excitação e emissão, 485 nm e 515 nm, respectivamente. As leituras foram feitas em espectrofluorímetro PerkinElmer modelo VICTOR X4 a intervalos de um minuto durante 30 minutos. Todo o procedimento foi conduzido a 37°C e um tampão fosfato de potássio (pH 7,0) foi usado como solvente.

Os resultados foram expressos em µmol/L equivalente Trolox[®] (ET), sendo calculados pela equação da reta obtida pela curva de calibração com o padrão Trolox[®] ($r^2 = 0,984$):

$$y = 0,3635 + 0,8547x,$$

em que x é o valor de ORAC expresso em µmol ET/L e y é a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência (AUC) da amostra ou padrão, menos a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência do branco, sendo que a AUC pode ser calculada pela equação:

$$AUC = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{n+1}/f_0),$$

em que f_0 é a intensidade inicial da fluorescência e f_n é a intensidade da fluorescência no tempo n .

A produção de hidroperóxidos dienos conjugados (DC) foi usada para medir a oxidação dos lipídios como descrito por Kiokias et al. (2006). Foram adicionados 50 µL de leite a 2,5 mL de uma solução 2:1 isooctano/2-propanol (v/v) e agitados por um minuto. As amostras foram filtradas em filtro de membrana 0,22 µm PTFE

(Spritzen, Shanghai, China) e a absorvância foi determinada com espectrofotômetro UV-Vis. As concentrações de DC nas amostras de leite foram calculadas pelo monitoramento da absorvância a 232 nm e usando a absorvidade molar do ácido linoleico ($e = 27,000$).

- Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi o quadrado Latino 4 x 4, com quatro tratamentos, quatro vacas e quatro períodos experimentais. As variáveis avaliadas foram submetidas a análise de variância segundo o segundo modelo estatístico:

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

em que: Y_{ijk} = variáveis observadas, μ = média geral; A_i = efeito do animal i , variando de 1 a 4; P_j = efeito do período j , variando de 1 a 4; T_k = efeito do tratamento k , variando de 1 a 4; e_{ijk} = erro aleatório. Todos os efeitos foram considerados fixos, exceto o efeito de animal que foi considerado aleatório.

Os dados foram interpretados usando o PROC MIXED do SAS (*Statistical Analysis System, versão 9.2. - 2001*). Contrastes ortogonais polinomiais foram usados para avaliar as respostas (linear e quadrática) nas variáveis medidas ao aumento do nível de compostos fenólicos na dieta. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey considerando 0,05 o grau de significância.

Resultados e discussão

O fornecimento do produto à base de própolis (PBP) não influenciou ($P > 0,05$) o consumo de MS (kg/dia), porém, esta variável se comportou de forma quadrática ($P = 0,05$) quando expressa em relação ao peso corporal (PC) e peso corporal metabólico (Tabela 3). O maior consumo de MS (kg/100 kg PC e g/kg PC^{0,75}) ocorreu para o tratamento contendo a menor dose diária de flavonoides (DDF), enquanto o tratamento com a maior DDF apresentou consumo inferior ao verificado para o tratamento controle. O efeito observado para o consumo de MS em relação ao PC e PC^{0,75} pode ser atribuído a ação do PBP, já que o nível de inclusão de óleo foi semelhante para todos os tratamentos (2,23% da MS) e o conteúdo de extrato etéreo na dieta foi de 47,5 g/kg de matéria seca.

Tabela 3 – Consumo de matéria seca e componentes nutritivos em dietas de vacas recebendo dietas com óleo de soja e níveis crescentes de compostos fenólicos de produto a base de própolis

Item	Tratamentos				EPM	P ¹		
	DDF0	DDF37	DDF63	DDF88		Prop	L	Q
CMS ² (kg/dia)	15,65	16,26	15,41	14,29	1,31	0,12	0,06	0,12
CMS (kg/100 kg PC)	2,69	2,77	2,73	2,64	0,16	0,15	0,22	0,05
CMS (g/kg PC ^{0,75})	0,131	0,135	0,133	0,129	0,01	0,15	0,22	0,05
Digestibilidade total ³ (DT) (kg/kg)								
DTMS	0,646	0,676	0,689	0,677	0,013	0,19	0,10	0,14
DTMO	0,671	0,701	0,706	0,695	0,012	0,28	0,20	0,15
DTPB	0,712	0,748	0,741	0,735	0,005	0,01	0,03	0,01
DTEE	0,855	0,885	0,910	0,857	0,008	0,01	0,39	0,002
DTFDN _{CP}	0,486	0,548	0,550	0,517	0,019	0,16	0,31	0,05
DTFDA	0,361	0,456	0,418	0,462	0,032	0,21	0,11	0,46
DTCT	0,652	0,680	0,678	0,670	0,014	0,55	0,45	0,27
DTCNF	0,792	0,815	0,818	0,807	0,012	0,40	0,34	0,17
NDT ⁴	70,63	73,64	74,82	72,50	1,23	0,05	0,20	0,01

¹Efeito geral da própolis (Prop) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses avaliadas. ²CMS = Consumo de matéria seca. ³MS = matéria seca, MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta, FDN_{CP} = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, FDA = fibra em detergente ácido, EE = extrato etéreo, CHT = carboidratos totais, CNF = carboidratos não fibrosos. ⁴NDT = nutrientes digestíveis totais, calculado de acordo com Weiss (1999). EPM – erro padrão da média dos tratamentos.

O fornecimento de até 63 mg de flavonoides/dia por meio do PBP melhorou (P<0,05) a digestibilidade total da PB, EE e o NDT. O comportamento quadrático (P<0,05) observado para estas variáveis e para a digestibilidade total da FDN_{CP}, indica que o consumo de quantidades muito elevadas de flavonoides pode limitar o crescimento de bactérias fermentadoras de proteína, fibra e extrato etéreo e, conseqüentemente, prejudicar o aproveitamento da dieta.

Os maiores valores para a digestibilidade total da PB foram observados para os tratamentos DDF37 e DDF63. Como a digestibilidade ruminal não foi determinada não é possível afirmar se o aumento na digestibilidade total foi decorrente do aumento deste parâmetro no rúmen ou no intestino.

No entanto, pesquisas anteriores realizadas com produtos semelhantes ao avaliado neste estudo, atestaram o efeito da própolis sobre a redução da

digestibilidade ruminal e aumento no fluxo intestinal de proteína (Aguiar, 2012; Simioni, 2011; Prado et al., 2010ab). Ainda, cepas de bactérias proteolíticas como *Prevotella albensis*, *Prevotella ruminicola*, *Peptostreptococcus* sp. e *Clostridium aminophilum*, foram sensíveis a ação dos compostos bioativos identificados em extratos de própolis análogos ao utilizado para a elaboração do produto avaliado neste estudo (Aguiar, 2012). Sendo assim, parece que os compostos fenólicos do extrato seco de própolis têm efeito positivo sobre a redução da digestão ruminal, aumento no fluxo intestinal de proteína e, possivelmente, na digestibilidade intestinal da proteína.

O efeito quadrático ($P=0,05$) observado para a digestibilidade da FDN_{CP} também pode estar relacionado com a sensibilidade de bactérias ruminais a ação da própolis. Aguirar (2012) avaliou a sensibilidade de cinco cepas de bactérias fibrilolíticas ao extrato de própolis em diferentes concentrações e verificou que quatro delas (*Fibrobacter succinogenes* S85, *Ruminococcus flavefaciens* FD-1, *Ruminococcus albus* 7 e *Butyrivibrio fibrisolvens* DSMZ 3071) apresentaram sensibilidade ao produto.

O efeito quadrático ($P<0,05$) observado para a concentração de NDT indica maior disponibilidade de energia digestível para os tratamentos DDF37 e DDF63 e é reflexo do aumento na digestibilidade total da PB, EE e FDN_{CP} verificada para estes tratamentos. O consumo de PBP aumentou o NDT para todos os tratamentos, porém, o maior aumento ocorreu para a dose de 63 mg de flavonoides/dia, em que a concentração NDT foi aproximadamente 6% maior em relação ao controle.

As variáveis relacionadas ao metabolismo do nitrogênio no rúmen, avaliados por meio da excreção total de alantoína, absorção de purinas e síntese de proteína bruta microbiana não foram influenciadas ($P>0,05$) pelos tratamentos (Tabela 4).

As proporções de alantoína excretada na urina (91,87%) e a excreção de derivados de purinas no leite (6,04%) foram próximas aos valores de 90,51% e 5% propostos por Chizzotti et al. (2007) e Chen & Gomes (1992) para estas variáveis, respectivamente. Da mesma forma, o valor médio observado para a eficiência de síntese de PB microbiana foi de 132,05 g de PB microbiana/kg de NDT consumido, próximo ao estimado pelo NRC (2001) de 130 g de proteína microbiana/kg de NDT ingerido. Portanto, o possível aumento no fluxo intestinal de proteína para os tratamentos DDF37 e DDF63, não influenciou o metabolismo ruminal do nitrogênio e a produção de proteína bruta microbiana, que não diferiu entre os tratamentos.

Tabela 4 – Volume urinário, absorção e excreção de alantoína e derivados de purinas e eficiência de síntese de proteína microbiana de vacas recebendo dietas com níveis crescentes de compostos fenólicos de produto à base de própolis

Item ²	Tratamentos					P ¹		
	DDF0	DDF37	DDF63	DDF88	EPM	Prop	L	Q
VU	11,85	12,50	11,29	14,14	1,35	0,38	0,30	0,57
AcU	12,21	13,00	12,19	13,57	1,43	0,46	0,42	0,27
Ureia	136,39	142,40	151,75	128,23	15,30	0,36	0,71	0,14
ALA	276,82	265,50	280,44	263,57	23,12	0,19	0,25	0,31
DPL	18,23	18,18	17,71	17,28	2,34	0,32	0,09	0,63
DP	306,31	282,30	305,52	288,32	30,73	0,12	0,37	0,65
Pur. abs	340,36	312,16	339,50	319,06	35,73	0,12	0,37	0,66
N mic	247,44	226,94	246,82	231,86	25,98	0,12	0,36	0,66
PB mic	1546,52	1418,38	1542,61	1449,73	162,37	0,12	0,36	0,66
Ef. Síntese	139,06	123,68	137,16	128,28	14,07	0,11	0,35	0,46

¹Efeito geral da própolis (Prop) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses avaliadas. ²VU – volume urinário (L/dia); ALA – alantoína mmol/dia; AcU – ácido úrico (mmol/dia); Ureia (mmol/L); DP – derivativos purina (mmol/dia); DPL – derivativos purina no leite (mmol/dia); Pur. abs – purinas absorvidas (mmol/dia); N mic – nitrogênio microbiano (g/dia); PB mic – proteína bruta microbiana (g/dia); Ef. síntese – eficiência de síntese de proteína microbiana (g PB microbiana/kg de NDT consumido).

De modo geral, a adição de própolis não influenciou ($P>0,05$) as concentrações plasmáticas dos metabólitos sanguíneos relacionados ao metabolismo de proteína, carboidratos e lipídios, com exceção do efeito quadrático ($P<0,05$) verificado para a concentração do HDL (Tabela 5).

O modo como a própolis interfere no metabolismo lipídico não é bem conhecido. No entanto, as concentrações de lipídios totais, triglicérides, colesterol e HDL não foram alteradas nas avaliações realizadas por Mani et al. (2006) após o tratamento de ratos com diferentes concentrações de própolis (1,3 e 6,0 mg/kg/dia), diferentes extratos (água ou etanol) e variações no tempo de administração (30, 90 ou 150 dias). Por outro lado, seu efeito modulador sobre o metabolismo de lipídios foi verificado por Fuliang et al. (2005) após a administração de extrato de própolis a ratos, que levou a redução dos níveis de glicose, colesterol total, triglicérides, LDL e VLDL, e aumento do HDL e da enzima superóxido dismutase.

Tabela 5 – Concentrações de metabólitos plasmáticos de vacas recebendo dietas com níveis crescentes de compostos fenólicos de produto à base de própolis

Item (mg/dL)	Tratamentos				EPM	P ¹		
	DDF0	DDF37	DDF63	DDF88		Prop	L	Q
Ureia	39,00	35,75	39,00	36,75	1,92	0,28	0,56	0,71
Ác. úrico	0,48	0,60	0,50	0,50	0,05	0,11	0,86	0,09
Glicose	66,00	67,50	68,75	68,00	2,57	0,88	0,54	0,67
Triglicérides	15,00	15,50	14,75	16,25	2,14	0,95	0,75	0,82
Colesterol	158,75	163,00	165,75	158,00	11,97	0,65	0,98	0,26
HDL	95,43	102,68	103,43	91,10	8,37	0,08	0,41	0,02
LDL	60,25	57,50	59,50	62,00	4,79	0,87	0,69	0,53
VLDL	3,00	3,10	2,95	4,75	0,96	0,53	0,28	0,41

¹Efeito geral da própolis (Prop) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses avaliadas.

A quantidade de flavonoides totais consumida não alterou ($P>0,05$) a composição percentual ou a produção diária de gordura, proteína, lactose e sólidos totais no leite (Tabela 6). Estes resultados são contrários aos observados por Freitas et al. (2009) que ao avaliarem os efeitos da adição de extrato etanólico de própolis na alimentação de vacas leiteiras observaram aumento no teor de proteína e na produção de leite. Da mesma forma, Lana et al. (2005) ao estudarem a inclusão de própolis e óleo na dieta de cabras em lactação, observaram sinergismo entre a adição destes ingredientes e verificaram aumento nos teores de gordura, proteína e sólidos totais no leite.

O aumento no consumo de flavonoides totais via PBP influenciou ($P<0,05$) a concentração de AG na gordura do leite (Tabela 7). Não houve efeito ($P>0,05$) da dose de flavonoides sobre os AG de cadeia curta (AGCC). Porém, as concentrações dos AG 10:0 e 12:0 reduziram linearmente ($P<0,05$) em função do aumento na dose de flavonoides, enquanto o 13:0, 14:0, 14:1n-5 e 16:1n-7 apresentaram efeito quadrático ($P<0,05$). As concentrações dos demais AG com até 16 carbonos não foram influenciadas pelos tratamentos ($P>0,05$).

As alterações observadas na composição de alguns AG presentes na gordura do leite mostram que a inclusão do PBP interfere parcialmente na síntese *de novo* dos AG de cadeia curta e média em dietas de vacas leiteiras com 2,23% de óleo de soja, provavelmente por influenciar a produção de acetato e β -hidroxibutirato, precursores

para a síntese *de novo* deste grupo de AG pelas células epiteliais da glândula mamária (Palmquist et al., 1993).

Tabela 6 – Produção e composição química do leite de vacas recebendo dietas com níveis crescentes de compostos fenólicos de produto à base de própolis

	Tratamentos					P ¹		
	DDF0	DDF37	DDF63	DDF88	EPM	Prop	L	Q
PL (kg/dia)	18,25	18,20	17,61	17,41	2,33	0,42	0,15	0,89
PLC (kg/dia) ²	15,35	15,10	14,93	15,37	1,84	0,67	0,93	0,26
	Concentração (%)							
Gordura	3,01	2,88	2,99	3,28	0,22	0,36	0,18	0,24
Proteína	3,39	3,49	3,56	3,53	14,71	0,33	0,12	0,56
Lactose	4,63	4,5	4,62	4,60	0,07	0,84	0,82	0,61
Sólidos totais	11,98	11,90	12,16	12,37	0,30	0,28	0,10	0,35
CCSlog10 ³	1,86	2,10	1,73	1,90	0,36	0,91	0,89	0,93
	Produção (kg/dia)							
Gordura	0,537	0,520	0,526	0,562	0,07	0,65	0,40	0,35
Proteína	0,611	0,627	0,619	0,606	0,07	0,54	0,58	0,23
Lactose	0,838	0,830	0,811	0,799	0,01	0,57	0,21	0,94
Sólidos totais	2,16	2,15	2,13	2,14	0,23	0,82	0,47	0,78

¹Efeito geral da própolis (Prop) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses avaliadas. ²PLC (kg/dia) = Produção de leite corrigida para 4% de gordura de acordo com equação do NRC (2001): PLC = (0,4 x Produção leite (kg/dia)) + [(15 x (Produção gordura x Produção leite/100)]. ³CCSlog10 = Contagem de células somáticas.

Embora a utilização de aditivos antimicrobianos esteja relacionada com alterações na composição em AG da gordura do leite (Jenkins et al., 2006; Palmquist et al., 1993), Eifert et al. (2006) não observaram efeito da interação entre óleo de soja e monensina sobre a composição em AG na gordura do leite; e atribuíram a ausência de efeito da monensina a pouca influência da alteração nas proporções dos ácidos graxos voláteis sobre os AG de cadeia média resultantes da síntese *de novo* nas células epiteliais da glândula mamária.

Houve efeito (P<0,05) das doses de flavonoides sobre as concentrações do 18:2n-6c, 18:3n-3 e 9c,11t CLA. As concentrações de 18:2n-6c e 9c,11t CLA apresentaram efeito quadrático (P<0,05). Porém, enquanto os maiores valores para a concentração do 18:2n-6c foram determinados para as doses mais baixas de flavonoides totais (DDF37 e DDF63), as maiores concentrações do 9c,11t CLA

Tabela 7 – Composição em ácidos graxos da gordura do leite de vacas recebendo dietas com níveis crescentes de compostos fenólicos de produto à base de própolis

Ácido graxo	Tratamentos				EPM	P ¹		
	DDF0	DDF37	DDF63	DDF88		Prop	L	Q
mg/g de lipídios totais								
4:0	1,96	1,75	1,80	1,79	0,19	0,86	0,61	0,61
6:0	2,26	1,83	2,13	2,62	0,28	0,33	0,30	0,15
8:0	2,73	2,90	3,21	2,62	0,26	0,47	0,99	0,20
10:0	13,45	12,63	10,43	9,56	1,19	0,15	0,04	0,98
12:0	21,91	17,46	20,38	16,89	1,21	0,002	0,003	0,43
13:0	0,70	0,58	0,59	0,70	0,05	0,09	0,92	0,02
13:1n-5	1,32	0,91	1,00	1,08	0,12	0,19	0,29	0,09
14:0	86,07	74,28	72,72	74,19	2,20	0,01	0,003	0,01
14:1n-5	11,06	12,72	12,73	8,52	0,98	0,07	0,13	0,02
15:0	6,61	5,50	6,42	6,35	0,43	0,27	0,94	0,22
15:1n-5	3,33	2,82	2,94	2,96	0,28	0,62	0,46	0,38
16:0	225,54	229,14	221,99	222,31	6,61	0,85	0,59	0,81
16:1n-7	11,27	8,35	10,69	12,06	0,91	0,08	0,25	0,04
16:1n-5	4,29	4,05	4,65	4,70	0,32	0,38	0,19	0,62
17:0	4,64	4,81	4,68	4,61	0,19	0,71	0,72	0,39
17:1n-7	4,42	6,05	4,12	4,36	0,77	0,35	0,56	0,40
18:0	112,93	112,13	115,03	113,37	4,69	0,97	0,85	0,93
18:1n-9 _t	41,23	38,22	32,40	30,87	4,58	0,40	0,12	0,88
18:1n-9 _c	279,97	321,38	311,71	309,07	17,60	0,20	0,21	0,13
18:2n-6 _c (LA) ²	24,69	25,73	26,67	22,79	1,61	0,07	0,25	0,03
18:3n-3 (LNA) ³	2,10	1,58	1,95	2,18	0,18	0,06	0,33	0,02
9 _c ,11 _t (CLA) ⁴	6,82	5,43	5,19	5,56	0,39	0,05	0,04	0,04
10 _t ,12 _c (CLA) ⁴	1,65	1,44	1,42	1,52	0,16	0,65	0,51	0,31
20:0	1,44	1,18	1,31	1,26	0,10	0,37	0,41	0,32
20:3n-6	0,74	0,67	0,61	0,74	0,07	0,22	0,49	0,07
20:4n-6	1,04	0,98	1,01	1,09	0,11	0,81	0,62	0,44
Somatório dos ácidos graxos								
Monoinsaturados ⁵	356,90	394,51	380,24	373,60	18,07	0,40	0,60	0,18
Poli-insaturados ⁶	37,04	35,82	36,85	33,84	2,14	0,11	0,06	0,33
Saturados ⁷	480,22	464,17	460,68	456,27	8,55	0,31	0,10	0,52
Sat:Insat	1,22	1,08	1,11	1,14	0,05	0,24	0,33	0,09
n-6	26,47	27,37	28,30	24,59	1,73	0,08	0,25	0,03
n-3	2,10	1,58	1,95	2,18	0,18	0,06	0,33	0,02
n-6:n-3	12,69	17,39	15,29	11,36	1,21	0,05	0,30	0,01

¹Efeito geral da própolis (Prop) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses avaliadas. ²LA = ácido linoleico, ³LNA = ácido linolênico, ⁴CLA = ácido linoleico conjugado, ⁵Soma dos ácidos graxos monoinsaturados, ⁶Soma dos ácidos graxos poli-insaturados, ⁷Soma dos ácidos graxos saturados.

ocorreram para a dose mais alta e para o tratamento controle. Este resultado indica que a intensidade de biohidrogenação do 18:2n-6_c é menor para os tratamentos DDF37 e DDF63 e maior para doses mais elevadas, pois o 9_c,11_t CLA é o principal

intermediário da clássica rota de biohidrogenação do 18:2n-6c no rúmen (Bauman & Griinari, 2001).

A concentração 18:3n-3 também apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$), porém com comportamento contrário ao observado para o 18:2n-6c, indicando que as doses 37 e 63 mg de flavonoides/dia foram menos eficientes em evitar a biohidrogenação ruminal do 18:3n-3, pois as concentrações deste AG foram menores para os tratamentos DDF37 e DDF63.

Cepas de bactérias como a *Anaerovibrio lipolytica* e *Butyrivibrio* VA têm preferência por substratos diferentes (Lourenço et al., 2010) e estão relacionadas com mudanças na concentração de 18:2n-6c e produtos finais da biohidrogenação decorrentes de mudanças no ambiente ruminal em função de alterações na dieta (Gudla et al., 2012). As doses de compostos fenólicos podem ter influenciado o crescimento destas bactérias, ou interferido no desenvolvimento de outras cepas que resultaram em mudanças no ambiente ruminal e induziram mudanças na preferência pelo substrato utilizado para biohidrogenação.

Apesar das alterações observadas para a concentração de alguns AG de cadeia longa importantes para a saúde humana como 18:2n-6c; 9c,11t CLA e 18:3n-3, as mudanças decorrentes da adição do PBP não impactaram na qualidade final da gordura do leite, pois os teores de AG poli-insaturados (AGPI), monoinsaturados (AGMI) e saturados (AGS) foram semelhantes entre os tratamentos ($P > 0,05$). A razão n-6:n-3 apresentou efeito quadrático ($P < 0,05$) e o menor valor foi observado para a maior dose de flavonoides totais. Este resultado foi decorrente o efeito das doses de flavonoides sobre a biohidrogenação dos AGPI, pois os tratamentos DDF37 e DDF63 promoveram, simultaneamente, aumento da concentração de 18:2n-6c e redução na concentração do 18:3n-3.

As concentrações de polifenóis e flavonoides totais, a atividade antioxidante do leite, medida por meio da redução do ferro, e a estabilidade oxidativa, determinada por meio da concentração de dienos conjugados (DC), não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos tratamentos (Tabela 8). Entretanto, houve efeito ($P < 0,05$) da dose de flavonoides totais para a atividade antioxidante determinada por captura radicalar pelo método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

Tabela 8 – Concentração de compostos fenólicos, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa do leite de vacas recebendo dietas com óleo de soja e níveis crescentes de própolis

Item ²	Tratamentos					P ¹		
	DDF0	DDF37	DDF63	DDF88	EPM	Prop	L	Q
PLF (µg EAG/mL)	39,72	45,03	47,92	50,46	6,74	0,49	0,16	0,79
FT (mg EQ/L)	8,38	15,77	13,63	13,66	2,38	0,09	0,12	0,07
RFE (µg/mL)	36,44	34,31	35,02	36,46	3,72	0,97	0,96	0,65
ORAC (µmol ET)	5154,37	6907,69	7935,17	8550,79	421,42	0,01	0,001	0,23
DC (mmol/kg gordura)	40,75	41,27	40,69	32,49	2,76	0,17	0,08	0,16

¹Efeito geral da própolis (Prop) ou efeito linear (L) ou quadrático (Q) para as doses avaliadas. ²FT = Flavonoides totais, PLF = Polifenóis, RFE = Poder de redução do ferro, ORAC = Oxygen Radical Absorbance Capacity, DC = dienos conjugados.

De acordo com Cigut et al. (2011) a maior parte dos estudos para avaliação da atividade antioxidante da própolis foi realizada *in vitro* e, portanto, não se pode assumir com base nestes resultados, que os compostos antioxidantes presentes em várias substâncias bioativas expressem as mesmas atividades em nível celular. No entanto, a atividade antioxidante dos flavonoides encontrados no PBP pode também ser evidenciada *in vivo*, pois a estabilidade oxidativa do leite determinada por ORAC aumentou linearmente ($P < 0,05$) em função da dose diária de flavonoides. Este resultado indica que a transferência de compostos com ação antioxidante da dieta para o leite é dose dependente.

Produtos à base de própolis têm capacidade antioxidante e sua adição à dieta de vacas leiteiras aumenta a transferência de antioxidantes e previne a oxidação lipídica da gordura do leite (Cottica et al., 2011). Sendo assim, o aumento da capacidade antioxidante do leite determinada pelo método ORAC, indica que os compostos bioativos da própolis protegeram a gordura do leite contra oxidação, porque houve redução linear ($P = 0,08$) na concentração dos dienos conjugados em função do aumento no consumo de flavonoides totais.

Resultados de pesquisa indicam que os flavonoides podem atuar como antioxidantes tanto em meio lipídico como aquoso. A ação dos flavonoides foi comprovada por meio da preservação de AG poli-insaturados na membrana dos eritrócitos, pelo aumento da capacidade antioxidante do plasma e pelo efeito poupador de lipoproteínas de baixa densidade e vitamina E (Pietta, 2000). Além disso, alguns componentes da própolis se comportam como antioxidantes hidrofílicos

que atuam na conservação da vitamina C e reduzem a concentração de hidroperóxidos lipídicos no intestino grosso (Sun et al., 2000).

A atividade antioxidante da própolis é correlacionada com o conteúdo total de flavonoides, com destaque para a ação do ácido cafeico, CAPE (éster fenil do ácido cafeico), Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico), quercetina, kaempferol (Kumazawa et al., 2004) e galangina (Russo et al., 2002). Alguns destes compostos foram identificados no extrato seco de própolis avaliado neste estudo (Figura 1) e podem ser os responsáveis pelo resultado positivo da própolis na proteção dos AG da gordura do leite contra a oxidação.

Conclusão

O consumo de 37 a 63 mg de flavonoides totais/dia melhora a digestibilidade da proteína bruta, extrato etéreo, fibra em detergente neutro e, conseqüentemente, a concentração de nutrientes digestíveis totais na dieta. Os tratamentos propostos melhoram a qualidade da gordura do leite por meio do aumento da capacidade antioxidante. Portanto, doses mais elevadas de flavonoides devem ser utilizadas para melhorar a estabilidade oxidativa do leite, pois a transferência de compostos com atividade antioxidante é dose dependente.

Referências

- AGUIAR, S.C. **Quantificação e caracterização dos compostos ativos da própolis e seus efeitos sobre a nutrição e qualidade do leite de vacas e cepas bacterianas do rúmen.** 2012. 132f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis.** 15.ed. Virginia, Washington: Arlington, 1990. 1298p.
- BAUMAN, D.L.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p.15-29, 2001.
- BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SÁEZ, J.A. et al. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v.52, n.8, p.1479–1482, 1999.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- CIGUT, T.; POLAK, T.; GASPERLIN, L. et al. Antioxidative Activity of Propolis Extract in Yeast Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, p.11449–11455, 2011.
- CHEN, X.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details.** Bucksburn: Rowett Research Institute, 1992. 21p. (Occasional publication).
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de ureia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.138-146, 2007.
- COTTICA, S.M.; AGUIAR, S.C.; PAULA, E.M. et al. Antioxidant activity in milk of dairy cows fed diets containing propolis-based products. **Journal of Dairy Science**, v.94 (E-Suppl. 1), p.621, 2011.
- EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LANNA, D.P.D. et al. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.219-228, 2006.
- FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE, S.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1, p.497-509, 1957.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p.48-51, 1999.
- 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.
- FULIANG, H.U.; HEPBURN, H.R.; XUAN, H, et al. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with Diabetes mellitus. **Pharmacological Research**, v.51, p.147-152, 2005.
- GUDLA, P.; ISHLAK, A.; ABUGHAZALEH, A.A. The effect of forage level and oil supplement on *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Anaerovibrio lipolytica* in continuous culture fermenters. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v.25, n.2, p.234–239, 2012.
- HAN, J.; BRITTEN, M.; ST-GELAIS, D. et al. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. **Food Chemistry**, v.124, p.1589-1594, 2011.

- HARTMAN, L.; LAGO, R.C. A Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v.22, p.475-476, 1973.
- JENKINS, T.C.; MCGUIRE, M.A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.4, p.1302-1310, 2006.
- JOSEPH, J. D. & ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. **Journal of Association of Official Analytical Chemical International**, v.75, n.3, p.488-506, 1992.
- KIOKIAS, S.N.; DIMAKOU, C.P.; TSAPROUNI, I.V.; OREOPOULOU, V. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. **Food Biophysics**, v.3, p.115-123, 2006.
- KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v.84, p. 329-339, 2004.
- LANA, R.D.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.
- LOURENÇO, M.; RAMOS-MORALES, E.; WALLACE, R.J. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. **Animal**, v.4, n.7, p. 1008-1023, 2010.
- MAIA, E.L., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.53, p.27-35, 1993.
- MANI, F.; DAMASCENO, H.C.R.; NOVELLI, E.L.B. et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.95-98, 2006.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.
- OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1621-1629, 2001.
- PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1753-1771, 1993.
- PAPAS, A.M. Diet and antioxidants status. **Food Chemistry and Toxicology**, v.37, p.999-1007, 1999.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v.63, n.7, p.1035-42, 2000.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1336-1345, 2010a.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2055-2065, 2010b.
- RUSSO, A.; LONGOB, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangina. **Fitoterapia**, v.73, Supl. 1, p21-29, 2002.

- SÁNCHEZ, N.; MIRANDA, S.; VIT, P. et al. Propolis protects against oxidative stress in human saliva. **Journal of ApiProduct & ApiMedical Science**. v.2, p.72-76, 2010.
- SHIMIZU, k.; ASHIDA, H.; MATSUURA, Y. et al. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian própolis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.424, p.181–188, 2004.
- SIMIONI, F.L. **Própolis como aditivo alimentar para bovinos de corte**. 2011. 91f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P.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.12, p.3562-3577, 1992.
- SUN, F.; HAYAMI, S.; HARUNA, S. et al. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.1462–1465, 2000.
- 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**. v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VISENTAINER, J.V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v.35, n. 2, p.274-279, 2012.
- VOLTOLINI, T.V., SANTOS, G.T., ZAMBOM, M.A. Influencia dos estádios de lactação sobre a contagem de células somáticas do leite de vaca da raça holandesa e identificação de patógenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v.23, p.961-966, 2001.
- WEISS, W. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.
- WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J.; ILSMAA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Agricultural Science**, v.59, n.1, p.381-385, 1962.
- WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.99–105, 1998.
- ZHU, Q.Y.; HACKMAN, R.M.; ENSUNSA, J.L. et al. Antioxidative Activities of Oolong Tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6929-6934, 2002.
- ZULUETA, A.; MAURIZI, A.; FRÍGOLA, A. et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. **International Dairy Journal**, v.19, p.380-385, 2009.

III - Digestibilidade dos nutrientes e parâmetros ruminais de vacas leiteiras recebendo própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso

Resumo - Os efeitos da administração ruminal e/ou perfusão abomasal de própolis e óleo de soja sobre a digestibilidade dos nutrientes, parâmetros ruminais e eficiência de síntese microbiana foram determinados neste estudo. Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, multíparas, com aproximadamente 203 dias de lactação, canuladas no rúmen e distribuídas em quadrado Latino 4x4, de acordo com os tratamentos: 1) própolis e óleo de soja administrados no rúmen, 2) própolis e óleo perfundidos no abomaso, 3) própolis administrada no rúmen e óleo perfundido no abomaso e 4) própolis perfundida no abomaso e óleo administrado no rúmen. Foram administrados diariamente, 400 mL de óleo de soja e 63,04 mg de flavonoides totais, presentes em 15 g de produto à base de própolis. O tempo de perfusão abomasal foi de 20 horas/dia sendo este período dividido em duas etapas de 10 horas que antecederiam os horários de ordenha. O local de administração da própolis e do óleo não interferiu nos coeficientes de digestibilidade total dos nutrientes. A administração ruminal da própolis isoladamente ou em associação com óleo de soja manteve a produção total de ácidos graxos de cadeia curta, o pH e concentração de nitrogênio amoniacal no rúmen. Para a dose testada, não foi possível verificar ação da própolis como aditivo antimicrobiano em dietas de vacas leiteiras, uma vez que a presença desse componente no rúmen não interferiu nos parâmetros ruminais avaliados e na eficiência de síntese de proteína bruta microbiana.

Palavras-chave: aditivo, atividade antimicrobiana, extrato de própolis, flavonoides, perfusão

Digestibility of nutrients and ruminal parameters of cows receiving propolis and soybean oil on rumen or abomasum

Abstract - The effects of ruminal and/or abomasal infusion of propolis and soybean oil on nutrient digestibility, ruminal parameters and microbial efficiency were evaluated. Four multiparous Holstein cows, cannulated in the rumen, with approximately 203 days in lactation, were assigned to a 4x4 Latin square, according to the following treatments: 1) propolis and soybean oil administered in the rumen, 2) propolis and oil infused in the abomasum, 3) propolis administered in the rumen and oil infused in the abomasum and 4) propolis abomasal infused and oil administered in the rumen. Total daily amount of propolis (15 g/cow/day) and oil (400 mL) were divided equally into two doses. The abomasal infusion time was 20 hours/day and this period was divided in two phases of 10 hours that preceded milking. The propolis and oil local administration had no effect on nutrients digestibility, pH and ammonia concentration. Ruminal administration of propolis singly or in combination with soybean oil did not affect the fermentation conditions and did not change the total production of short chain fatty acids. For the dose tested, it was not possible to verify the action of propolis as antimicrobial additive in diets of dairy cows, because the presence of this component in the rumen had no effect on nutrient digestibility, and ruminal microbial efficiency.

Keywords: additive, antimicrobial activity, flavonoids, infusion, propolis extract

Introdução

O uso de aditivos com a finalidade de manipular a fermentação ruminal configura entre as práticas mais utilizadas para aumentar a eficiência produtiva dos bovinos. No entanto, a produção de alimentos de qualidade requer a adoção de práticas e produtos adequados e que contribuam para a manutenção de elevados índices de produção, sem deixar de considerar a sustentabilidade econômica, social e ambiental das etapas envolvidas no processo.

Os ionóforos estão entre os aditivos mais estudados e utilizados em dietas de ruminantes. Porém, mudanças de comportamento do mercado consumidor de produtos de origem animal tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas para investigar a possibilidade do uso de compostos naturais como aditivos alimentares. A própolis se insere perfeitamente neste conceito, por apresentar em sua composição elementos com caráter antimicrobiano capazes de interferir nos produtos finais da fermentação ruminal.

A composição da própolis é bastante complexa e inclui mais de 300 constituintes (Khalil, 2006). Dentre eles, nenhum contribui mais para os efeitos observados do que os flavonoides e seus derivados. Os flavonoides ocorrem naturalmente na forma glicosilada ou aglicona. São considerados potentes inibidores do crescimento de bactérias, mas a intensidade do efeito inibitório parece ser variável e dependente da estirpe bacteriana (Basile et al., 1999). Flavonoides na forma glicosilada são hidrolisados pelas bactérias anaeróbias presentes no intestino grosso de humanos, que usam a glicose como fonte de energia e liberam a aglicona correspondente que fica disponível para outros organismos ou é prontamente absorvida pelas células por apresentarem caráter lipofílico (Schaefer et al., 2003). Contudo, não existem relatos a respeito da ocorrência e da extensão da degradação destes elementos pelas bactérias anaeróbias que colonizam o trato digestório dos bovinos.

A inclusão de óleo nas dietas de bovinos pode melhorar a eficiência microbiana por atuar de modo semelhante aos ionóforos na redução da fermentação ruminal dos carboidratos, diminuição da concentração de amônia, aumento na produção de propionato e diminuição da metanogênese; uma vez que ácidos graxos (AG) de cadeia longa são tóxicos para bactérias Gram-positivas e protozoários e não afetam bactérias Gram-negativas (Nagaraja et al., 1997). Portanto, a aplicação

conjunta de própolis e óleo de soja poderia atuar diretamente na população microbiana e melhorar o aproveitamento das dietas de ruminantes.

Neste sentido, objetivou-se avaliar os efeitos da administração ruminal ou abomasal de um produto à base de própolis, associado ou não ao óleo de soja, sobre a digestibilidade dos nutrientes, parâmetros ruminais, eficiência de síntese de proteína microbiana e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras.

Material e métodos

- Local

O experimento foi conduzido no setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia e no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia e Farmacologia, pertencentes à Universidade Estadual de Maringá.

- Animais

Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, múltiparas, canuladas no rúmen, com peso corporal médio e desvio padrão de $568,5 \pm 50,73$ kg, com aproximadamente 203 dias de lactação, ordenhadas duas vezes ao dia às 06h e às 17h e alojadas em baias individuais em sistema *tie stall*.

- Dieta experimental e tratamentos

As vacas foram alimentadas com uma dieta basal (Tabela 1), fornecida às 07h, 14h e 19h. A dieta foi formulada para atender as exigências nutricionais de vacas com 600 kg de peso vivo e produção de 25 kg de leite/dia com 3,8% de gordura (NRC, 2001) e o consumo ajustado de modo que as sobras representassem 10% do volume consumido.

Os tratamentos avaliados consistiram na administração ruminal ou perfusão abomasal do produto à base de própolis (PBP) e óleo de soja distribuídos da seguinte forma: PR/OR – PBP e óleo de soja no rúmen (administração ruminal diária de 15 g de PBP e 400 mL de óleo de soja + perfusão abomasal de 10 L de água), PA/OA – PBP e óleo de soja no abomaso (perfusão abomasal diária de 15 g de PBP diluídos em 10 L de água + 400 mL de óleo de soja), PR/OA – PBP no rúmen e óleo de soja no abomaso (administração ruminal diária de 15 g de PBP e perfusão abomasal de

400 mL de óleo + 10 L de água) e PA/OR – PBP no abomaso e óleo no rúmen (perfusão abomasal de 15 g de PBP diluídos em 10 L de água e administração ruminal de 400 mL de óleo de soja).

A solução aquosa contendo PBP foi preparada diariamente, armazenada em recipiente de aço inox ao abrigo da luz e mantida constantemente sob agitação, para evitar a precipitação do produto e assegurar a homogeneidade da mistura durante o período de perfusão. Para realização da perfusão, uma sonda foi inserida através da cânula ruminal e do sulco omasal até o abomaso, segundo técnica descrita por Greesley et al. (2006). A posição da sonda era monitorada permanentemente para garantir a perfusão pós-ruminal.

Tabela 1 – Composição química e em ácidos graxos dos alimentos e proporção dos ingredientes usados nas dietas experimentais

	g/kg ¹								Dieta (%)
	MS	MO	PB	EE	FDN _{CP}	FDA	CHT	CNF	
Silagem milho	248,1	955,7	71,6	21,2	571,4	346,9	863,0	291,6	58,10
Farelo de soja	895,7	935,2	513,3	17,7	117,7	91,6	404,2	286,5	15,19
Milho moído	895,5	988,5	83,5	35,0	122,5	43,4	870,0	747,5	12,99
Farelo de trigo	913,6	957,9	176,4	32,2	344,9	115,9	749,3	404,4	9,43
Óleo de soja	-	-	-	991,3	-	-	-	-	2,10
Supl. Mineral ²	-	-	-	-	-	-	-	-	1,05
Cloreto de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20
Calcário	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52
Ureia	-	-	2810,0	-	-	-	-	-	0,42
Dieta	525,6	916,1	158,8	43,6	398,3	232,0	746,5	348,2	100,0

¹MS = matéria seca, MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, FDN_{CP} = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, FDA = fibra em detergente ácido, CHT = carboidratos totais, CNF = carboidratos não fibrosos, ²Composição mineral do suplemento (por kg de produto): 180 g de cálcio, 90 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 85 g de sódio, 100 mg de cobalto, 1000 mg de cobre, 1200 mg de manganês, 90 mg de iodo, 36 mg de selênio e 3000 mg de zinco.

- Produto à base de própolis (PBP)

O PBP fornecido às vacas foi preparado de acordo com metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999). A própolis que serviu de matéria-prima para a elaboração do produto foi coletada no apiário da FEI, localizado no interior de uma reserva de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) rodeada de mata nativa e alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). O extrato seco de própolis está registrado no

Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob nº 0605768-3. Sua preparação consiste na extração hidroalcoólica da própolis bruta, a fim de liberar suas substâncias ativas, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos. Subsequentemente, o conteúdo alcoólico é evaporado com o auxílio de um rotaevaporador e seco em *spray dryer*.

Foram administrados diariamente 15 g do PBP contendo 63,04 mg de flavonoides totais quantificados em apigenina (Tabela 2). O consumo de compostos fenólicos proposto para a execução deste projeto foi estabelecido com base em resultados obtidos em experimentos anteriores em que uma dose inicial do produto foi testada para os mesmos parâmetros avaliados neste estudo. A quantificação de flavonoides e ácidos fenólicos no produto avaliado foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com metodologia descrita por Aguiar (2012).

Tabela 2 – Ingestão diária de flavonoides totais quantificados em apigenina e ácidos fenólicos totais quantificados em ácido *p*-cumárico do produto à base de própolis

Composto fenólico ¹	mg/animal/dia
Flavonoides totais	63,04
Ácidos fenólicos totais ²	26,81
Artepillin C e CAPE	7,66

¹Quantidade de compostos fenólicos presentes em 15g do produto a base de própolis. ²Soma dos ácidos fenólicos agrupados no início do cromatograma com CAPE (éster fenetil do ácido cafeico) e Artepillin C (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico).

- Manejo dos animais e período experimental

A administração ruminal do PBP e óleo de soja foi realizada às 7h e 16h. Foram administrados diariamente, 400 mL de óleo de soja e 63,04 mg de flavonoides totais, presentes em 15 g de PBP. A dose diária de PBP foi fornecida em duas porções de 7,5 g do material, embrulhado em papel higroscópico e colocado diretamente no rúmen. O óleo de soja foi administrado em duas porções de 200 mL, distribuídas em diferentes pontos do rúmen.

O óleo foi perfundido a uma taxa de 20 mL/h enquanto a taxa de perfusão da água e solução aquosa contendo própolis foi de 500 mL/h. A perfusão abomasal teve duração de 20 h/dia e foi realizada com bombas peristálticas de alta vazão para a água e solução aquosa contendo a própolis, e bombas peristálticas de baixa vazão

para a perfusão do óleo. O tempo total de perfusão foi dividido em duas etapas de 10 horas que antecediam as ordenhas. A primeira etapa tinha início às 7h, logo após a ordenha da manhã, sendo finalizada às 17h, seguida da ordenha e um período de descanso para os animais de duas horas. O início da segunda etapa ocorria às 20h e se estendia até às 6h do dia seguinte, quando os animais eram novamente liberados para a ordenha.

O experimento teve duração de 84 dias e foi dividido em quatro períodos experimentais. Cada período experimental teve duração de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação aos tratamentos, cinco para coleta de dados e dois dias para descanso dos animais. Durante os primeiros sete dias de adaptação, os animais receberam apenas 50% da dose de própolis e óleo de soja em apenas 10 horas de perfusão. A partir do oitavo dia até o final do período experimental, receberam 100% das doses avaliadas nos tratamentos com 20 horas de perfusão.

O óxido de cromo (Cr_2O_3) foi utilizado como indicador externo para predição do fluxo fecal. Foram utilizados 15 g do indicador, divididos em duas doses de 7,5 g. O material foi pesado e acondicionado em papel higroscópico e colocado diretamente no rúmen às 7h e 16h, do quarto ao décimo oitavo dia de cada período experimental. Para determinar a taxa de diluição, no décimo nono dia do período experimental, antes da alimentação da manhã, 30 g de Co-EDTA diluídos em 500 mL de água destilada foram administrados diretamente no rúmen dos animais (Uden et al., 1980).

- Coleta e processamento das amostras

Amostras de silagem e concentrado foram coletadas e misturadas para formar uma amostra composta/período. As sobras foram pesadas individualmente, homogeneizadas e amostradas, resultando em uma amostra composta por animal e por período. Amostras de fezes foram coletadas durante três dias consecutivos, com intervalos de seis horas entre coletas e incremento de duas horas de um dia para o outro para evitar repetições nos horários, totalizando 12 amostras/animal/período. Foram coletados aproximadamente 200 g de amostra por horário. Imediatamente após a coleta e amostragem, o material foi congelado a -20°C para posterior processamento e análise.

Após descongelamento, as amostras foram secas em estufa de ventilação forçada de ar (MA035-MARCONE[®]) a 55°C por 72 horas, moídas individualmente, em moinhos de faca (MA048-MARCONE[®]), utilizando peneira com crivo de 1 mm,

e misturadas com base no peso seco, para formar amostras compostas por tratamento e por período.

As amostras de líquido ruminal para a determinação do pH, nitrogênio amoniacal (N-NH₃) e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) foram coletadas no 19º dia do período experimental, das sete às 13h, a cada duas horas, sendo o pH determinado imediatamente após a coleta. Uma alíquota de 100 mL de líquido ruminal foi coletada e dividida em duas porções de 50 mL. Uma das porções foi acidificada com 1 mL de ácido sulfúrico 20% e utilizada para determinação do teor de amônia, enquanto a outra, sem adição de ácido, foi utilizada para determinação da concentração de ácidos graxos de cadeia curta.

Para determinar a taxa de diluição, no 19º dia do período experimental, foram coletados aproximadamente 20 mL de líquido ruminal, antes do início da infusão (tempo zero) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 e 24 horas após a administração do indicador.

Para determinar a eficiência de síntese de proteína microbiana foram coletadas amostras *spot* de urina, por micção espontânea, aproximadamente quatro horas após a alimentação da manhã. As amostras foram filtradas em papel filtro e uma alíquota de 10 mL de urina foi diluída em 40 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,036 N, a fim de evitar destruição bacteriana dos derivados de purina e a precipitação do ácido úrico. As amostras de urina foram conservadas em geladeira (5°C) e, analisadas para determinação da concentração de alantoína. A segunda alíquota foi coletada, sem diluição com ácido sulfúrico, para determinação da creatinina, ácido úrico e ureia.

Foram colhidas amostras de sangue no 15º dia de cada período experimental, antes da alimentação da manhã por punção da veia mamária, para determinação da ureia, glicose, colesterol total, HDL, LDL e VLDL. O material foi coletado em tubos plásticos tipo vacutainer. Imediatamente após a coleta os tubos foram armazenados em caixa térmica e levados ao laboratório para a realização das análises.

- Análises químicas

As amostras dos alimentos, das sobras e das fezes foram analisadas para teores de matéria seca (MS, método n° 934.01), matéria orgânica (MO, método n° 924.05), proteína bruta (PB, método n° 920.87) e extrato etéreo (EE método n° 920.85) de acordo com AOAC (1990). A fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada segundo Van Soest et al. (1991), sem uso do sulfito de sódio e com

inclusão de α -amilase termo resistente. A fibra em detergente ácido (FDA) foi determinada de acordo com método nº 973.18 (AOAC, 1990). A concentração de cromo (Cr) nas amostras de fezes foi determinada por espectrofotometria de absorção atômica, conforme técnica descrita por Willians et al. (1962). Os carboidratos totais (CT) foram estimados por meio da equação descrita por Sniffen et al. (1992).

$$CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%Matéria Mineral)$$

Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram estimados pela diferença entre CT e a FDN corrigida para cinza e proteína (FDN_{CP}). O NDT da dieta experimental foi obtido segundo Weiss (1999):

$$\%NDT = \%PBD + \%FDN_{CPD} + \%CNFD + \% (EED \times 2,25)$$

em que: PBD = proteína bruta digestível, FDN_{CPD} = fibra em detergente neutro corrigida para cinza e proteína digestível, CNFD = carboidratos não fibrosos digestíveis, EED = extrato etéreo digestível.

O teor de amônia foi determinado por destilação do líquido ruminal com hidróxido de potássio 2 N, de acordo com técnica descrita por Ferner (1965), modificada por Vieira (1980). Os AGCC foram determinados segundo técnica descrita por Palmquist & Conrad (1971), utilizando cromatógrafo gasoso (Finnigan 9001), com coluna de vidro empacotada (4% CW 20M – 80/120 Carbopack B-DA) de 2,0 m x 1/8", acoplado a um integrador e um microcomputador. O nitrogênio foi usado como gás de arraste na vazão de 25 mL/minuto. O oxigênio como gás comburente na vazão de 175 mL/minuto e o hidrogênio como gás combustível na vazão de 15 mL/minuto. As temperaturas de operação foram: injetor 220°C, detector de ionização de chama 250°C, temperatura inicial da coluna: 140°C, por 1 minuto; seguida de uma rampa de aquecimento com aumento de 10°C por minuto até atingir 220°C, mantendo por 2 minutos.

As concentrações de cobalto (Co) nas amostras foram determinadas por espectrometria de absorção atômica (Uden et al., 1980). A taxa de passagem de fluidos e as curvas de concentração ruminal do Co foram ajustadas ao modelo exponencial unicompartimental de Hungate (1966), citado por Colucci (1984) e os parâmetros da dinâmica da fase líquida foram calculados de acordo com Colucci et al. (1990).

Para determinar a eficiência de síntese de proteína microbiana as amostras de urina foram analisadas para determinação da concentração de alantoína segundo

metodologia descrita por Chen & Gomes (1992). Para determinação da creatinina, ácido úrico e ureia foram utilizados *kits* comerciais (Analisa®). As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Shimadzu modelo UV-1601) e as análises realizadas imediatamente após a coleta das amostras.

A partir da concentração de creatinina na urina, foi estimado o volume urinário, dividindo a excreção diária de creatinina (mg/kg de peso corporal) pela concentração de creatinina (mg/L). Para determinação da excreção diária de creatinina foi adotado o valor médio de 23,41 mg/kg de PC, obtido por Oliveira et al. (2001), que determinaram a excreção de creatinina por vacas da raça Holandesa alimentadas com dietas com relação volumoso:concentrado e ingredientes semelhantes as do presente trabalho.

A produção de nitrogênio microbiano (N_{mic}) foi calculada a partir da quantidade de purinas absorvidas (X, mmol/dia), sendo estimada a partir da soma das excreções de derivados de purina (DP) no leite e urina (Y, mmol/dia), por meio da equação descrita por Chen & Gomes (1992):

$$Y = 0,85X + (0,385 PC^{0,75})$$

em que: 0,85 representa a recuperação de purinas absorvidas como DP e 0,385 PC^{0,75} representa a contribuição endógena líquida de DP para a excreção total. Em bovinos leiteiros, a contribuição endógena de derivados de purinas é tomada como uma constante de 0,385 mmol/kg de PC^{0,75} por dia.

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Y, g N/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), por meio da equação também descrita por Chen & Gomes (1992):

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

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

A estimativa de proteína microbiana (PB_{mic}) foi obtida ao se multiplicar a síntese de N microbiano por 6,25, enquanto a eficiência de síntese de proteína microbiana foi determinada como: Ef. Síntese (g/kg) = PB_{mic} (g)/CNDT (kg), em que CNDT = consumo de nutrientes digestíveis totais.

A determinação da concentração plasmática da ureia, glicose, colesterol total, HDL, LDL e VLDL foi realizada em laboratório terceirizado por meio de *kits*

comerciais (Analisa[®]), em analisador automático para bioquímica sanguínea (Merck Vitalab Selectra[®]).

- Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi o quadrado Latino 4 x 4, com quatro tratamentos, quatro vacas e quatro períodos experimentais. As variáveis avaliadas foram submetidas a análise de variância segundo modelo estatístico:

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

em que: Y_{ijk} = variáveis observadas, μ = média geral; A_i = efeito do animal i , variando de 1 a 4; P_j = efeito do período j , variando de 1 a 4; T_k = efeito do tratamento k , variando de 1 a 4; e_{ijk} = erro aleatório. Todos os efeitos foram considerados fixos, exceto o efeito de animal que foi considerado aleatório.

Os dados referentes ao consumo de matéria seca (CMS) coeficiente de digestibilidade total (DT) dos nutrientes, cinética ruminal e concentração de metabólitos no sangue e na urina foram interpretados por análise de variância usando o procedimento GLM do SAS (*Statistical Analysis System, versão 9.2. - 2001*). Os resultados obtidos para pH, concentração de nitrogênio amoniacal e AGCC foram analisados usando o PROC MIXED do SAS para medidas repetidas no tempo. As diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey considerando 0,05 o grau de significância.

Resultados e discussão

O local de administração do PBP e do óleo não influenciou ($P > 0,05$) o consumo de matéria seca e os coeficientes de digestibilidade total dos nutrientes (Tabela 3). Variações no consumo de MS e dos nutrientes foram relatadas na literatura em estudo com adição de própolis em dietas de ruminantes (Lana et al., 2005). Porém, outras pesquisas envolvendo o uso da própolis em dietas de bovinos (Zawadzki et al., 2011; Prado et al., 2010a), bubalinos (Prado et al., 2010b), vacas leiteiras (Stelzer et al., 2009) e cabras leiteiras (Lana et al., 2007), não verificaram efeito deste aditivo sobre o consumo.

A inclusão de óleo em dietas de ruminantes foi apontada como causa da redução na digestibilidade da fibra dos alimentos (Jenkins, 1993), podendo limitar o consumo de MS em função da maior retenção da fração fibrosa no rúmen (Allen,

2000). No entanto, o consumo de matéria seca não foi influenciando quando 2,1% de óleo de soja com base na matéria seca foram administrados diretamente no rúmen, pois segundo Martin et al. (2008) este efeito é mais comum quando volumes maiores de óleo são suplementados.

Tabela 3 – Consumo de matéria seca e componentes nutritivos em dietas de vacas recebendo perfusão de produto à base de própolis e óleo de soja no rúmen ou no abomaso

Item ²	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
CMS (kg/dia)	15,550	16,583	16,408	16,680	0,668	0,641
CMS (kg/100 kg PC)	2,810	2,973	2,860	2,883	0,222	0,960
CMS (g/kg PC ^{0,75})	136,16	144,50	139,89	141,30	9,344	0,934
Digestibilidade total (DT) ³ (kg/kg)						
DTMS	0,665	0,658	0,666	0,666	0,006	0,612
DTMO	0,686	0,680	0,694	0,687	0,006	0,463
DTPB	0,724	0,715	0,730	0,732	0,004	0,063
DTFDN _{CP}	0,559	0,529	0,531	0,541	0,014	0,375
DTFDA	0,522	0,518	0,520	0,524	0,010	0,869
DTEE	0,896	0,896	0,899	0,895	0,002	0,372
DTCHT	0,664	0,657	0,666	0,665	0,006	0,569
DTCNF	0,786	0,780	0,789	0,781	0,004	0,153
NDT	0,724	0,686	0,712	0,736	0,016	0,150

¹Local da perfusão: Rum = rúmen, Abo = abomaso; ^aPrópolis e óleo no rúmen, ^bPrópolis e óleo no abomaso, ^cPrópolis no rúmen e óleo no abomaso, ^dPrópolis no abomaso e óleo no rúmen. ²CMS = Consumo de matéria seca. ³MS = matéria seca, MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta, FDN_{CP} = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, FDA = fibra em detergente ácido, EE = extrato etéreo, CHT = carboidratos totais, CNF = carboidratos não fibrosos, ²NDT = nutrientes digestíveis totais, calculado de acordo com Weiss (1999). EPM – erro padrão da média dos tratamentos.

Os coeficientes de digestibilidade total dos nutrientes foram semelhantes ($P > 0,05$), independentemente do local de administração do PBP, do óleo de soja ou de ambos. Assim, não é possível afirmar com base nestes dados, que os componentes biologicamente ativos da própolis sejam capazes de melhorar as condições de fermentação ruminal e/ou a digestão intestinal e, conseqüentemente, proporcionar maior quantidade de nutrientes metabolizáveis. A adição de produto análogo à dieta de vacas leiteiras reduziu os coeficientes de digestão ruminal da proteína e aumentou

a digestão intestinal da matéria orgânica, proteína e carboidratos totais, sem diferir na digestibilidade total destes nutrientes quando comparado a dieta controle (Aguiar, 2012).

Não houve efeito ($P > 0,05$) da interação tratamento x tempo de coleta após a alimentação para pH e concentração de nitrogênio amoniacal ($N-NH_3$) no líquido ruminal (Tabela 4), porém, houve efeito de horário de coleta ($P < 0,05$) para ambas variáveis (Figura 1).

Os dados observados para pH apresentaram comportamento quadrático ($pH = 0,0197h^2 - 0,1874h + 6,8656$, $R^2 = 0,9628$) e o valor mínimo estimado foi de 6,28; observado 3,36 horas após a alimentação da manhã. Como proposto por Russell & Dombrowski (1980), o pH ruminal não limitou o desenvolvimento de bactérias fibrilolíticas pois esteve permanentemente acima de 6,2. Este resultado pode ser atribuído à relação volumoso:concentrado estabelecida, que foi de 60:40, ao alto teor de FDN e ao fracionamento da dieta em três porções ao longo do dia, o que contribuiu para o aumento no tempo de mastigação e produção de saliva pelos animais.

Tabela 4 - pH, concentração de N-amoniaco ($N-NH_3$) e ácidos graxos de cadeia curta no fluido ruminal de vacas recebendo perfusão de produto à base de própolis e óleo de soja no rúmen ou no abomaso

Item	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
pH	6,33	6,44	6,41	6,40	0,032	0,180
$N-NH_3$ (mg/100mL)	16,42	15,98	15,13	14,12	1,096	0,513
Ácidos graxos de cadeia curta (mmol)						
Total	133,16	127,54	130,98	123,51	3,880	0,393
Acetato	92,041	89,525	94,182	85,192	3,026	0,279
Propionato	27,705a	24,971b	23,503b	25,802ab	0,720	0,031
Butirato	13,409	13,048	13,299	12,512	0,489	0,602
Acetato:Propionato	3,330b	3,621b	4,039a	3,341b	0,089	0,004

¹Local da perfusão: Rum = rúmen, Abo = abomaso; ^aPrópolis e óleo no rúmen, ^bPrópolis e óleo no abomaso, ^cPrópolis no rúmen e óleo no abomaso, ^dPrópolis no abomaso e óleo no rúmen. EPM – erro padrão da média dos tratamentos.

A concentração de $N-NH_3$ mostrou comportamento cúbico em função do tempo de coleta após a alimentação ($N-NH_3 = 3,340h^3 - 28,716h^2 + 74,038h - 37,8$, $R^2 = 1,00$). Os valores estimados para máxima e mínima produção de nitrogênio amoniacal foram 22,14 e 12,13 (mg/100 mL) observados 1,96 e 3,77 horas após a

alimentação da manhã, respectivamente. Sendo assim, a concentração de nitrogênio amoniacal não limitou a fermentação microbiana no rúmen, pois esteve permanentemente acima de 5 mg/100 mL (Satter & Slyter, 1974).

O efeito inibidor da própolis sobre a produção de amônia e a atividade específica de produção de amônia foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo* e os resultados atribuídos à inibição da população microbiana com alta capacidade de desaminação de aminoácidos (Oliveira et al., 2006; Oliveira et al., 2004; Stradiotti Júnior et al., 2004ab). Este resultado foi corroborado por Aguiar (2012) que verificou efeito antimicrobiano de diferentes extratos de própolis sobre cepas de bactérias altamente produtoras de amônia. Apesar disso, o local de administração do PBP ou óleo de soja não teve efeito ($P>0,05$) sobre a produção de amônia.

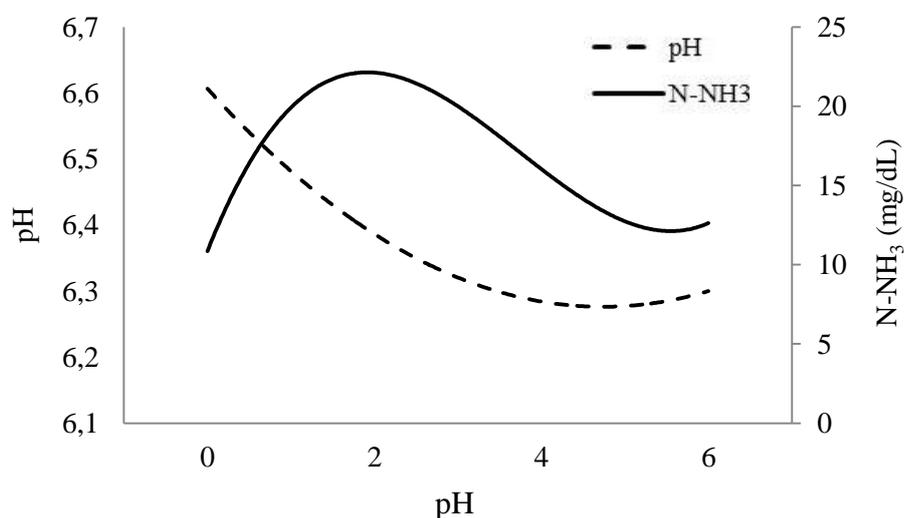


Figura 1 - Concentração de amônia e pH no fluido ruminal de vacas recebendo própolis e óleo de soja no rúmen ou no abomaso.

A produção total de AGCC e as concentrações de acetato e butirato não foram alteradas pelo local de perfusão dos tratamentos ($P>0,05$), porém, a concentração de propionato foi maior ($P<0,05$) quando óleo de soja foi administrado no rúmen, independentemente da presença do PBP. A razão acetato:propionato foi maior ($P<0,05$) para o tratamento em que a própolis foi administrada no rúmen e o óleo no abomaso e não diferiu ($P>0,05$) entre os demais tratamentos. Este comportamento se deve basicamente a elevada concentração de acetato observada para este tratamento (Tabela 4). Em relação ao tempo de amostragem, a produção de AGCC se ajustou ao

modelo quadrático ($P < 0,05$) e não houve interação entre tratamento e horário de coleta.

A presença de óleo no rúmen levou a maior concentração de propionato. Este efeito é semelhante ao provocado pelos ionóforos, pois segundo Nagaraja et al. (1997), o aumento da proporção molar de propionato, associado a redução da proporção de acetato e butirato, são efeitos característicos dos ionóforos sobre a fermentação ruminal. Contudo, neste caso, as concentrações de acetato e butirato na foram alteradas.

Apesar das alterações na produção de AGCC serem atribuídas ao local de administração do óleo, não se pode descartar o potencial da própolis como aditivo antimicrobiano, pois existem relatos de que a suscetibilidade de microrganismos à própolis é dose dependente (Ozturk et al., 2010) e apenas uma dose do produto foi avaliada neste estudo.

A ausência de efeitos relacionados aos parâmetros ruminais e concentração de metabólitos decorrentes da fermentação microbiana dos componentes dietéticos, pode estar relacionada ao metabolismo sofrido pelos componentes bioativos da própolis quando expostos a ação da microbiota ruminal. Apesar de existirem informações a respeito da biodisponibilidade de alguns desses compostos para humanos e algumas espécies de não ruminantes, muito pouco se sabe a respeito do metabolismo ruminal, da extensão das modificações sofridas por estas estruturas químicas e o impacto que tais transformações podem exercer sobre seu potencial de ação.

As diferenças marcantes do trato gastrointestinal de ruminantes e monogástricos foram lembradas por Berger et al. (2012) ao afirmarem que a biodisponibilidade dos flavonoides para bovinos não pode ser predita a partir de resultados obtidos com espécies não ruminantes. Ao estudarem a biodisponibilidade da quercetina após aplicação ruminal e intravenosa nas formas aglicona e glicosilada, os resultados determinados pelos autores mostraram que existe algum tipo de proteção contra a degradação microbiana quando utilizada na forma glicosilada, já sua biodisponibilidade foi dez vezes maior que na forma aglicona.

Neste caso, como os flavonoides encontrados no PBP estão predominantemente na forma aglicona, é provável que estariam expostos a ação microbiana e sujeitos a conversão em compostos derivados. Isto poderia explicar a ausência de resultados relacionados ao uso da própolis como agente antimicrobiano

no rúmen, como verificado neste estudo. No entanto, este resultado não inviabiliza a utilização deste produto como fonte de substâncias com ação anti-inflamatória, imunoreguladora e antioxidante, já que mesmo após as transformações sofridas no ambiente ruminal podem ser absorvidos e detectados na corrente sanguínea (Cushnie & Lamb 2005).

Embora a ação antimicrobiana da própolis seja amplamente relatada na literatura científica (Bankova, et al. 2000), e sua atuação tenha sido comprovada tanto sobre bactérias Gram-positivas como Gram-negativas (Khalil, 2006), seu potencial como aditivo antimicrobiano capaz de alterar as condições de fermentação e agir sobre o crescimento de bactérias ruminais ainda precisa ser melhor investigado.

Os parâmetros de cinética ruminal da fração líquida e o volume ruminal não foram influenciados ($P>0,05$) pelos tratamentos (Tabela 5). Os fatores que influenciam a dinâmica da fase líquida estão relacionados ao nível de ingestão, nível de fibra e forma física da dieta, taxa de digestão dos alimentos e utilização de aditivos, como os ionóforos, por exemplo.

Tabela 5 – Cinética da fração líquida e volume ruminal de vacas recebendo perfusão de própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso

	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
Kpl (h^{-1})	0,093	0,090	0,083	0,097	0,496	0,328
Tempo retenção (h)	10,744	11,266	12,365	10,397	0,645	0,252
Taxa Fluxo (L/h)	11,676	11,311	9,831	12,250	0,681	0,110
Tx. reciclagem (vezes/dia)	2,249	2,156	1,991	2,319	0,119	0,328
Volume ruminal (L)	125,40	127,33	121,06	126,62	7,965	0,916
Volume ruminal (%PC)	21,84	22,70	21,17	22,42	1,947	0,820

¹Local da perfusão: Rum = rúmen, Abo = abomaso; ^aPrópolis e óleo no rúmen, ^bPrópolis e óleo no abomaso, ^cPrópolis no rúmen e óleo no abomaso, ^dPrópolis no abomaso e óleo no rúmen. Kpl (fase líquida) = Taxa de passagem da fase líquida (/h); Tx. Reciclagem = Taxa de reciclagem (vezes/dia). EPM – erro padrão da média dos tratamentos.

Embora já tenha sido postulado que a própolis apresenta mecanismo de ação semelhante ao dos ionóforos (Mirzoeva et al., 1997), a presença do PBP no ambiente ruminal não influenciou a taxa de passagem de líquidos, independentemente da presença do óleo. A ausência de efeito sobre os parâmetros de dinâmica da fase líquida pode ser atribuída também ao emprego da mesma dieta basal, relação

volumoso:concentrado e a semelhança no consumo de MS entre os tratamentos (Tabela 3).

O volume urinário, absorção e excreção de alantoína e derivados de purinas e a eficiência de síntese de proteína microbiana não foram modificados ($P>0,05$) pelos tratamentos (Tabela 6). A participação percentual da alantoína excretada via urina esteve dentro da faixa recomendada na literatura. Embora Chen & Gomes (1992) sugiram que a excreção de alantoína represente de 80 a 85% do total de derivados de purinas excretados na urina, Chizzotti et al. (2007) obtiveram média de 90,51% para a excreção desse metabólito com vacas leiteiras de média produção. O valor médio de alantoína excretada via urina foi de 258,49 mmol/dia e representou 90,12% do total de derivados de purinas, valores próximos aos propostos para esta variável.

Tabela 6 – Volume urinário, absorção e excreção de alantoína e derivados de purinas e eficiência de síntese de proteína microbiana de vacas recebendo perfusão de própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso

	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
VU	12,218	12,176	11,715	13,689	3,499	0,082
ALA	254,73	252,77	265,34	261,13	19,508	0,943
AcU	33,001	39,031	23,695	31,167	5,273	0,122
DP	289,19	284,50	285,03	288,55	21,292	0,995
DPL	20,273	20,470	19,513	19,748	1,758	0,394
Pur. abs	319,91	314,60	315,16	319,32	25,458	0,995
N mic	232,58	228,71	229,12	232,15	18,508	0,995
PB mic	1453,61	1429,46	1432,02	1450,92	115,68	0,995
Ef. Síntese	131,77	128,61	136,46	127,73	7,524	0,928

¹Local da perfusão: Rum = rúmen, Abo = abomaso; ^aPrópolis e óleo no rúmen, ^bPrópolis e óleo no abomaso, ^cPrópolis no rúmen e óleo no abomaso, ^dPrópolis no abomaso e óleo no rúmen. VU – volume urinário (L/dia); ALA – alantoína mMol/dia; AcU – ácido úrico (mMol/dia); DP – derivados purina (mMol/dia); DPL – derivados purina no leite (mMol/dia); Pur. abs – purinas absorvidas (mMol/dia); N mic – nitrogênio microbiano (g/dia); PB mic – proteína bruta microbiana (g/dia); Efic. – eficiência de síntese de proteína microbiana (g PB microbiana/kg de NDT consumido). EPM – erro padrão da média dos tratamentos.

Da mesma forma, a excreção de alantoína e ácido úrico no leite, que representou 6,97% do total excretado, estiveram próximos ao proposto por Chen &

Gomes (1992), que sugerem média de 5% para este parâmetro. Para a eficiência de síntese de proteína microbiana, a média observada foi de 131,14 g de PB/kg de NDT, valor próximo ao estimado pelo NRC (2001) de 130 g de proteína microbiana/kg de NDT ingerido.

As concentrações plasmáticas dos metabólitos relacionados ao metabolismo energético (glicose) e proteico (ureia) não apresentaram variações ($P>0,05$) em função do local de administração do PBP ou do óleo de soja. No entanto, as concentrações de colesterol total, HDL e LDL diferiram ($P<0,05$) entre os tratamentos (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros sanguíneos (mg/dL) de vacas recebendo perfusão de própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso

Item	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
Ureia	34,25	28,75	31,75	33,25	2,210	0,261
Glicose	60,25	65,50	64,25	61,00	2,088	0,316
Colesterol	143,25b	176,50a	169,75a	142,00b	11,642	0,002
HDL	82,03b	95,50a	89,75a	79,75b	4,592	0,012
LDL	59,48b	78,65a	78,10a	60,30b	7,883	0,014
VLDL	1,75	2,35	1,90	1,95	0,151	0,126

¹Local da perfusão: Rum = rúmen, Abo = abomaso; ^aPrópolis e óleo no rúmen, ^bPrópolis e óleo no abomaso, ^cPrópolis no rúmen e óleo no abomaso, ^dPrópolis no abomaso e óleo no rúmen. EPM – erro padrão da média dos tratamentos.

A perfusão abomasal do óleo, independentemente da presença do PBP, elevou ($P<0,05$) em aproximadamente 21% a concentração de colesterol no plasma em relação a sua administração no rúmen. Os efeitos da própolis sobre o metabolismo lipídico ainda não estão muito bem esclarecidos. Os estudos realizados até o momento incluem somente humanos e modelos animais com a utilização de ratos e os resultados não são conclusivos. A administração de extrato própolis a ratos levou a redução dos níveis de glicose, colesterol total, triglicérides, LDL e VLDL, e aumentou os níveis de HDL e da enzima superóxido dismutase, sugerindo que a própolis pode ter efeito no controle da glicose sanguínea e modular o metabolismo de lipídios (Fuliang et al., 2005). Por outro lado, a concentração de lipídios totais, triglicérides, colesterol e HDL não foram alteradas nas avaliações realizadas por Mani et al. (2006) após o tratamento de ratos com diferentes concentrações de

própolis (1,3 e 6,0 mg/kg/dia), diferentes extratos (água ou etanol) e variações no tempo de administração (30, 90 ou 150 dias).

A exposição do óleo ao metabolismo ruminal resultou na concentração plasmática de 142,63 mg/dL de colesterol enquanto sua proteção por meio da perfusão no abomaso elevou para 173,13 mg/dL sua concentração no plasma. Comportamento semelhante foi observado para a HDL e LDL, em que a perfusão do óleo no abomaso aumentou a concentração desses metabólitos no plasma em relação à sua administração no rúmen.

Conclusão

A perfusão ruminal ou abomasal do produto à base de própolis, de forma isolada ou combinada com óleo de soja, não apresentou efeito sobre a digestibilidade dos nutrientes, parâmetros ruminais e produtos finais da fermentação dos nutrientes da dieta.

Referências

- AGUIAR, S.C. **Quantificação e caracterização dos compostos ativos da própolis e seus efeitos sobre a nutrição e qualidade do leite de vacas e cepas bacterianas do rúmen.** 2012. 132f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.1598-1624, 2000
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis.** 15.ed. Virginia, Washington: Arlington, 1990. 1298p.
- BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.
- BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SÁEZ, J.A. et al. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mosses. **Phytochemistry**, v.52, n.8, p.1479–1482, 1999.
- BERGER, L.M.; WEIN, S.; BLANK, R. et al. Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5047–5055, 2012.
- CHEN, X.; GOMES, M.J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of the technical details.** Bucksburn: Rowett Research Institute, 1992. 21p. (Occasional publication).
- CHIZZOTTI, M.L.; VALADARES FILHO, S.C.; VALADARES, R.F.D. et al. Consumo, digestibilidade e excreção de ureia e derivados de purinas em vacas de diferentes níveis de produção de leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.138-146, 2007.
- COLUCCI, P.E. **Comparative digestion and digesta kinetics in sheep and cattle.** 1984. 221f. Thesis (Ph.D. in Animal Science) - University of Guelph, Guelph.
- COLUCCI, P.E.; MACLEOD, G.K.; GROVUM, W.L. et al. Digesta kinetics in sheep and cattle fed diets with different forage to concentrate ratios at high and low intakes. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.2143-2156, 1990.
- CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, n.5, p.343–356, 2005.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p.48-51, 1999.
- FULIANG, H.U.; HEPBURN, H.R.; XUAN, H, et al. Effects of propolis on blood glucose, blood lipid and free radicals in rats with Diabetes mellitus. **Pharmacological Research**, v.51, p.147-52, 2005.
- GRESSLEY, T.F.; REYNAL, S.M.; OLMOS COLMENERO, J.J. Technical Note: Development of a Tool to Insert Abomasal Infusion Lines into Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3965-3967, 2006.
- HUNGATE, R. E. **The rumen and its microbes.** ed. Academic Press, New York, p. 533, 1966.
- JENKINS, T.C. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism - Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851-3863, 1993.
- KHALIL, M.L. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.7, n.1, p.22–31, 2006.
- LANA, R.D.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.

- LANA, R.P.; CAMARDELLI, M.M.L.; RODRIGUES, M.T. et al. Óleo de soja e própolis na alimentação de cabras leiteiras: consumo de matéria seca e de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p.191–197, 2007.
- MANI, F.; DAMASCENO, H.C.R.; NOVELLI, E.L.B. et al. Propolis: Effect of different concentrations, extracts and intake period on seric biochemical variables. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.95-98, 2006.
- MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J.P. et al. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. **Journal of Animal Science**, v.86, p.2642–2650, 2008.
- 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.
- NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; Van NEVEL, C.J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P.N.; STEWART, C.S. (Ed.) **The rumen microbial ecosystem**. 2.ed. Blackie Academic & Professional, 1997. p.523-632.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of beef cattle**. 7.rev.ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 2000. 242p.
- OLIVEIRA, A.S.; VALADARES, R.F.D.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de ureia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1621-1629, 2001.
- 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.
- OZTURK, H.; PEKCAN, M.; SIRELI, M. et al. Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, v.57, p.217-221, 2010.
- PALMIQUIST, D.; CONRAD, H. Origin of plasma fatty acids in lactating cows fed high fat diets. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3152, 1971.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.6, p.1336–1345, 2010a.
- PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P. et al. Efeito da adição de própolis e monensina sódica na digestibilidade e características ruminais em bubalinos alimentados com dieta à base de forragem. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.9, p.2055–2065, 2010b.
- RUSSELL, J.B.; DOMBROWSKI, D.B. Effect of pH on the efficiency of growth by cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**, v.39, p.604, 1980.
- SATTER, L.D.; SLYTER, L.L. Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production *in vitro*. **British Journal of Nutrition**, v.32, n.2, p.199-205. 1974.

- SCHAEFER, O.; HÈUMPEL, M.; FRITZEMEIER, K.H. et al. 8-Prenyl naringenin is a potent ER alpha selective phytoestrogen present in hops and beer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.84, p.359–360, 2003.
- SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P.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.12, p.3562-3577, 1992.
- STELZER, F.S.; LANA, R.D.P.; CAMPOS, M.J.D.S. et al. Desempenho de vacas leiteiras recebendo concentrado em diferentes níveis , associado ou não a própolis. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, n.7, p.1381–1389, 2009.
- STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.D.P. et al. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação in vitro de diferentes alimentos pela técnica de produção de gases. **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.
- UDEN, P.; COLUCCI, P.E.; VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.31, n.10, p.625-635, 1980.
- 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**. v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.
- VIEIRA, P.F. **Efeito do formaldeído na proteção de proteínas e lipídios em rações para ruminante**. Viçosa, MG:UFV, 1980. 98p. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal de Viçosa, 1980.
- WEISS, W. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61., 1999, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.
- WILLIAMS, C.H.; DAVID, D.J.; ILSMAA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal of Agricultural Science**, v.59, n.1, p.381-385, 1962.
- ZAWADZKI, F.; PRADO, I.N.; MARQUES, J.A. et al. Sodium monensin or ropolis extract in the diets of feedlot-finished bulls: effects on animal performance and carcass characteristics. **Journal of Animal and Feed Science**, v.20, n.1, p.16-25. 2011.

IV - Composição em ácidos graxos e atividade antioxidante do leite de vacas que receberam própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso

Resumo - Os efeitos da administração ruminal e/ou perfusão abomasal de própolis e óleo de soja sobre a composição química, composição em ácidos graxos e perfil oxidativo do leite foram determinados neste estudo. Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa múltiparas, com aproximadamente 203 dias de lactação, canuladas no rúmen e distribuídas em quadrado Latino 4x4, de acordo com os tratamentos: 1) própolis e óleo de soja administrados no rúmen, 2) própolis e óleo perfundidos no abomaso, 3) própolis administrada no rúmen e óleo perfundido no abomaso e 4) própolis perfundida no abomaso e óleo administrado no rúmen. O consumo de óleo foi de 400 mL/dia e a dose de flavonoides totais foi de 63,04 mg/animal/dia, fornecidos por meio de 15 g de produto à base de própolis. O tempo de perfusão abomasal foi de 20 horas/dia sendo este período dividido em duas etapas de 10 horas que antecederiam os horários de ordenha. O local de administração da própolis não teve efeito sobre a composição química do leite, porém, a perfusão abomasal do óleo provocou redução no percentual e na produção de gordura. A composição em ácidos graxos da gordura do leite foi alterada pelo local de administração do óleo e não sofreu interferência da própolis. As concentrações de compostos com atividade antioxidante e o perfil oxidativo do leite não foram influenciados pelo local de perfusão da própolis. A perfusão ruminal ou abomasal de óleo de soja influencia a composição em AG da gordura do leite, porém, o local de administração do produto à base de própolis capaz de fornecer 63,04 mg de flavonoides/dia, não tem efeito sobre a transferência de compostos fenólicos e não melhora a atividade antioxidante e a estabilidade oxidativa do leite.

Palavras-chave: ácidos graxos, aditivo, atividade antioxidante, extrato de própolis, flavonoides, perfusão

Milk fat acids profile and antioxidant activity of milk for dairy cows receiving product based propolis in rumen or abomasum

Abstract - The effects of ruminal and/or abomasal infusion of propolis based product and soybean oil on milk composition, milk fat acids profile and oxidative stability were evaluated. Four multiparous Holstein cows, cannulated in the rumen, with approximately 203 days in lactation, were assigned to a 4x4 Latin square design, according to the following treatments: 1) propolis and soybean oil administered in the rumen, 2) propolis and oil infused in the abomasum, 3) propolis administered in the rumen and oil infused in the abomasum and 4) propolis abomasal infused and oil administered in the rumen. Total daily amount of propolis (15g/cow/day) and oil (400mL) was divided equally into two doses. The abomasal infusion time was 20 hours/day and this period was divided in two phases of 10 hours that preceded milking. The site of propolis administration had no effect on milk production and composition; however, the oil abomasal infusion reduced milk fat concentration. Milk fatty acid composition was altered by the site of oil administration and did not suffer interference from propolis. Concentrations of compounds with antioxidant activity and milk oxidative profile were not influenced by the site of propolis perfusion. The ruminal or abomasal infusion of soybean oil influences milk fat acids composition, however, the site administration of 63.04 mg of flavonoids/day by propolis based product has no effect on transfer of phenolic compounds and does not improve the antioxidant activity and oxidative stability of milk.

Keywords: additive, antioxidant activity, fatty acids, flavonoids, infusion, propolis extract

Introdução

Os sistemas de produção pecuária dispõem de inúmeras tecnologias que visam incrementar a produção e a qualidade dos produtos de origem animal. A manipulação das dietas de vacas leiteiras a partir da inclusão de fontes de óleo visa, entre outros, alterar a composição em ácidos graxos (AG) da gordura do leite para melhorar seu valor nutritivo.

A quantidade e a fonte de gordura dietética são citadas por Jenkins & McGuire (2006) como fatores nutricionais com potencial para alterar a composição em AG da gordura do leite. No entanto, embora a utilização de alimentos com boa composição de AG represente uma alternativa para melhorar a qualidade nutricional do leite, a biohidrogenação ruminal e a conversão dos AG poli-insaturados em saturados tem importantes implicações para a saúde humana (Lourenço et al., 2010). Intermediários do metabolismo lipídico no rúmen como os isômeros *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 do CLA se mostraram eficientes em inibir o crescimento de células cancerígenas em humanos e suprimir o desenvolvimento de tumores em modelos animais (Shingfield et al., 2008). Assim, a busca por estratégias capazes de contornar este mecanismo de defesa das bactérias e melhorar a qualidade nutricional do leite via aumento das concentrações de AG benéficos para a saúde tem sido foco de muitas pesquisas.

Ação antimicrobiana e antioxidante foram atribuídas a parte dos componentes biologicamente ativos da própolis, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos (Laskar et al., 2010). Flavonoides são compostos antioxidantes que podem agir tanto na fase líquida como na fase lipídica atuando na eliminação de radicais livres (Lindmark-Mansson & Akesson, 2000). Estudos recentes confirmaram ação antimicrobiana de diferentes extratos de própolis sobre diversas cepas de microrganismos ruminais (Aguiar, 2012) e revelaram que o potencial antioxidante da própolis está diretamente relacionado com a concentração de compostos fenólicos (Cottica et al., 2011).

Os flavonoides são compostos ativos na prevenção da peroxidação lipídica e manutenção da qualidade do leite e, portanto, podem ser usados como ingredientes para produção de alimentos mais saudáveis (Zulueta et al., 2009). Espera-se que a maior disponibilidade de flavonoides resulte em maior absorção e transferência

destes compostos para o leite, e que sua ação antioxidante tenha efeito preventivo na oxidação dos AG poli-insaturados.

Portanto, este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o papel do metabolismo ruminal sobre a composição em AG, transferência de compostos fenólicos, atividade antioxidante e estabilidade oxidativa da gordura do leite de vacas recebendo perfusão de produto à base de própolis e óleo de soja no rúmen ou no abomaso.

Material e métodos

- Local

O experimento foi conduzido no setor de Bovinocultura de Leite da Fazenda Experimental de Iguatemi (FEI), no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal (LANA) do Departamento de Zootecnia, no Laboratório de Cromatografia do Departamento de Química e no Laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Farmácia e Farmacologia, pertencentes à Universidade Estadual de Maringá.

- Animais

Foram utilizadas quatro vacas da raça Holandesa, múltíparas, canuladas no rúmen, com peso corporal médio e desvio padrão de $568,5 \pm 50,73$ kg, com aproximadamente 203 dias de lactação, ordenhadas duas vezes ao dia às 6h e às 17h e alojadas em baias individuais em sistema *tie stall*.

- Dieta experimental e tratamentos

As vacas foram alimentadas com uma dieta basal (Tabela 1), fornecida às 7h, 14h e 19h. A dieta foi formulada para atender as exigências de vacas com 600 kg de peso vivo e produção de 25 kg de leite/dia com 3,8% de gordura (NRC, 2001) e o consumo ajustado de modo que as sobras representassem 10% do volume consumido.

Os tratamentos avaliados consistiram na administração ruminal ou perfusão abomasal do produto à base de própolis (PBP) e óleo de soja distribuídos da seguinte forma: PR/OR – PBP e óleo de soja no rúmen (administração ruminal diária de 15 g de PBP e 400 mL de óleo de soja + perfusão abomasal de 10 L de água), PA/OA – PBP e óleo de soja no abomaso (perfusão abomasal diária de 15 g de PBP diluídos em 10 L de água + 400 mL de óleo de soja), PR/OA – PBP no rúmen e óleo de soja

no abomaso (administração ruminal diária de 15 g de PBP e perfusão abomasal de 400 mL de óleo + 10 L de água) e PA/OR – PBP no abomaso e óleo no rúmen (perfusão abomasal de 15 g de PBP diluídos em 10 L de água e administração ruminal de 400 mL de óleo de soja).

Tabela 1 – Composição química e em ácidos graxos dos alimentos e proporção dos ingredientes usados nas dietas experimentais

	g/kg ¹								Dieta (%)
	MS	MO	PB	EE	FDN _{CP}	FDA	CHT	CNF	
Silagem milho	248,1	955,7	71,6	21,2	571,4	346,9	863,0	291,6	58,10
Farelo de soja	895,7	935,2	513,3	17,7	117,7	91,6	404,2	286,5	15,19
Milho moído	895,5	988,5	83,5	35,0	122,5	43,4	870,0	747,5	12,99
Farelo de trigo	913,6	957,9	176,4	32,2	344,9	115,9	749,3	404,4	9,43
Óleo de soja	-	-	-	991,3	-	-	-	-	2,10
Supl. Mineral ²	-	-	-	-	-	-	-	-	1,05
Cloreto de sódio	-	-	-	-	-	-	-	-	0,20
Calcário	-	-	-	-	-	-	-	-	0,52
Ureia	-	-	2810,0	-	-	-	-	-	0,42
Dieta	525,6	916,1	158,8	43,6	398,3	232,0	746,5	348,2	100,0
	Ácido graxo (mg/g de lipídios totais)								
Item	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6	18:3n-3	20:0	22:0		
Silagem de milho	205,15	21,52	187,10	331,11	121,20	6,98	7,00		
Farelo de soja	162,49	28,09	206,51	438,14	40,67	3,31	5,42		
Milho moído	124,42	17,23	330,76	393,23	7,71	6,09	2,31		
Farelo de trigo	191,76	9,82	177,02	435,73	27,57	2,04	2,60		
Óleo de soja	102,72	22,12	260,89	445,23	39,47	3,47	5,42		
Dieta total	180,28	20,40	205,21	360,45	81,03	5,61	5,55		

¹MS = matéria seca, MO = matéria orgânica, PB = proteína bruta, EE = extrato etéreo, FDN_{CP} = fibra em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, FDA = fibra em detergente ácido, CHT = carboidratos totais, CNF = carboidratos não fibrosos, ²Composição mineral do suplemento (por kg de produto): 180 g de cálcio, 90 g de fósforo, 20 g de enxofre, 20 g de magnésio, 85 g de sódio, 100 mg de cobalto, 1000 mg de cobre, 1200 mg de manganês, 90 mg de iodo, 36 mg de selênio e 3000 mg de zinco.

A solução aquosa contendo PBP foi preparada diariamente, armazenada em recipiente de aço inox ao abrigo da luz e mantida constantemente sob agitação, para evitar a precipitação do produto e assegurar a homogeneidade da mistura durante o período de perfusão. Para realização da perfusão, uma sonda foi inserida através da

cânula ruminal e do sulco omasal até o abomaso, segundo técnica descrita por Greesley et al. (2006). A posição da sonda era monitorada permanentemente para garantir a perfusão pós-ruminal.

- *Produto à base de própolis (PBP)*

O PBP fornecido às vacas foi preparado de acordo com metodologia desenvolvida por Franco & Bueno (1999). A própolis que serviu de matéria-prima para a elaboração do produto foi coletada no apiário da FEI, localizado no interior de uma reserva de eucalipto (*Eucalyptus* sp.) rodeada de mata nativa e alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*). O extrato seco de própolis está registrado no Instituto Nacional de Propriedade Industrial sob nº 0605768-3. Sua preparação consiste na extração hidroalcoólica da própolis bruta, a fim de liberar suas substâncias ativas, principalmente flavonoides e ácidos fenólicos. Subsequentemente, o conteúdo alcoólico é evaporado com o auxílio de um rotaevaporador e seco em *spray dryer*.

Foram administrados diariamente 15 g do PBP contendo 63,04 mg de flavonoides totais quantificados em apigenina (Tabela 2). O consumo de compostos fenólicos proposto para a execução deste projeto foi estabelecido com base em resultados obtidos em experimentos anteriores em que uma dose inicial do produto foi testada para os mesmos parâmetros avaliados neste estudo. A quantificação de flavonoides e ácidos fenólicos no produto avaliado foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com metodologia descrita por Aguiar (2012).

Tabela 2 – Ingestão diária de flavonoides totais quantificados em apigenina e ácidos fenólicos totais quantificados em ácido p-cumárico do produto à base de própolis

Composto fenólico ¹	mg/animal/dia
Flavonoides totais s	63,04
Ácidos fenólicos totais ²	26,81
Artepilin C e CAPE	7,66

¹Quantidade de compostos fenólicos presentes em 15g do produto a base de própolis. ²Soma dos ácidos fenólicos agrupados no início do cromatograma com CAPE e Artepilin C.

- Manejo dos animais e período experimental

A administração ruminal de própolis e óleo de soja foi realizada às 7h e 16h. Foram administrados diariamente, 400 mL de óleo de soja e 63,04 mg de flavonoides totais, presentes em 15 g de PBP. A dose diária de PBP foi fornecida em duas porções de 7,5 g do material, embrulhado em papel higroscópico e colocado diretamente no rúmen. O óleo de soja foi administrado em duas porções de 200 mL, distribuídas em diferentes pontos do rúmen.

O óleo foi perfundido a uma taxa de 20 mL/h enquanto a taxa de perfusão da água e solução aquosa contendo própolis foi de 500 mL/h. A perfusão abomasal teve duração de 20 h/dia e foi realizada com bombas peristálticas de alta vazão para a água e solução aquosa contendo a própolis, e bombas peristálticas de baixa vazão para a perfusão do óleo. O tempo total de perfusão foi dividido em duas etapas de 10 horas que antecediam as ordenhas. A primeira etapa tinha início às 7h, logo após a ordenha da manhã, sendo finalizada às 17h, seguida da ordenha e um período de descanso de duas horas. O início da segunda etapa ocorria às 20h e se estendia até às 6h do dia seguinte, quando os animais eram novamente liberados para a ordenha.

O experimento teve duração de 84 dias e foi dividido em quatro períodos experimentais. Cada período experimental teve duração de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação aos tratamentos, cinco para coleta de dados e dois dias para descanso dos animais. Durante os primeiros sete dias de adaptação, os animais receberam apenas 50% da dose de própolis e óleo de soja em apenas 10 horas de perfusão. A partir do oitavo dia até o final do período experimental, receberam 100% das doses avaliadas nos tratamentos com 20 horas de perfusão.

- Coleta e processamento das amostras

Para a análise da composição química e qualidade do leite, foram coletadas amostras de quatro ordenhas consecutivas durante o período de coleta. As amostras da manhã e da tarde foram misturadas para formar uma amostra composta por animal/dia, sendo que as alíquotas coletadas foram proporcionais ao volume de leite produzido em cada ordenha. Parte do volume amostrado foi mantida em temperatura ambiente e preservada com 2-bromo-2-nitropropano-1,3 diol (BRONOPOL), e encaminhado para o laboratório da APCBRH (Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa), para determinação dos teores de proteína, gordura, lactose, sólidos totais, ureia e contagem de células somáticas (CCS).

Outras duas amostras de leite foram coletadas e armazenadas a -20°C , sendo uma delas preservada sem adição de conservantes e utilizada para determinação da composição em AG da gordura do leite e a outra acondicionada em frascos plásticos contendo azida sódica, foi utilizada para determinação da estabilidade oxidativa e concentração de antioxidantes.

- *Análises químicas*

As concentrações de nitrogênio, gordura e lactose no leite foram determinadas por espectrofotometria de infravermelho (Bentley model 2000; Bentley Instrument, Inc., Chaska, MN, USA), seguindo procedimento 972.16 da AOAC (1990).

As concentrações de ureia foram determinadas pelo método colorimétrico com a reação de Berthelot usando o Chemspec 150 (Bentley Instrument, Inc., Chaska, MN, USA). A CCS foi obtida usando contador eletrônico (Somacount 500[®], Chaska, MN, USA), como descrito por Voltolini et al. (2001).

A dosagem dos ésteres metílicos dos AG da gordura do leite e dos alimentos foi realizada a partir da extração dos lipídios totais segundo Folch et al. (1957) e Bligh & Dyer (1959), respectivamente. Para transesterificação, o material foi submetido ao processo de metilação conforme metodologia descrita por Hartman & Lago (1973), modificado por Maia & Rodrigues-Amaya (1993).

Os ésteres de AG foram analisados em cromatógrafo gasoso Thermo Scientific[®] (Thermo Fisher Scientific Inc., USA), modelo Trace GC Ultra, equipado com injetor automático TriPlus, com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (100 m, 0,25 mm e 0,39 μm od, 100% cianopropil ligado). As vazões dos gases (White Martins, Praxair Technology Inc., USA) foram de 1,4 mL/min para o gás de arraste (H_2), 30 mL/min para o gás auxiliar (N_2), 30 mL/min e 300 mL/min para o H_2 e para o ar sintético da chama, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80.

As temperaturas do injetor e do detector foram 230°C e 240°C , respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 65°C por 4 minutos, seguido por uma primeira rampa de $16^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até atingir 185°C , permanecendo assim por 12 minutos. A segunda rampa foi programada, de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 235°C , permanecendo nesta temperatura por 9 minutos. O tempo total da análise foi de 35 minutos. As áreas dos picos foram determinadas pelo software ChromQuest, versão

5.0. As injeções foram realizadas em triplicatas e os volumes de injeção foram de 2 µL. A identificação dos AG foi baseada na comparação dos tempos de retenção aos de padrões de ésteres metílicos de AG. A quantificação de CLA e dos ésteres metílicos de AG das amostras foi feita por meio da comparação com tempos de retenção de uma mistura de padrões Sigma-Aldrich®. A quantificação (mg de ácido graxo/g de lipídios totais) foi feita usando o éster metílico do ácido tricosanoico como padrão interno (23:0), como descrito por Joseph & Ackman (1992). A concentração dos AG foi obtida por meio da utilização de um fator de correção teórico (Visentainer, 2012) para o detector de ionização de chama (FID). O conteúdo de AG foi calculado pela seguinte equação:

$$FA = \frac{A_X W_{IS} CF_X}{A_{IS} W_X CF_{AE}} \times 100$$

em que, FA é a quantidade de AG em mg/g de lipídios totais, A_X é a área do pico do ácido graxo, A_{IS} é a área do pico do padrão interno (IS) éster metílico do ácido tricosanoico (23:0), W_{IS} é o peso do padrão interno (mg) adicionado a amostra (mg), W_X é o peso da amostra (mg), CF_X é o fator de correção teórico, e CF_{AE} é o fator de correção necessário para expressar os resultados como mg de AG e não como ésteres metílicos.

O conteúdo total de polifenóis foi determinado usando o procedimento de Folin-Ciocalteu como descrito por Singleton & Rossi (1965) e usando o polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) de acordo com Han et al. (2011). Para a extração dos polifenóis das amostras de leite um mL da amostra foi diluído com 10 mL de metanol (100%). Os extratos foram filtrados com filtro de membrana 0,22 µm PTFE (Spritzen, Shanghai, China) em tubos totalmente protegidos da luz. Após a filtração, 125 µL da amostra foram misturados com 125 µL da solução de Folin-Ciocalteu (50%, v/v) e 2,25 µL de Na₂CO₃ (3,79 M). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e a leitura realizada a 760 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP 2000, Shanghai Spectrum, Shanghai, China).

Os compostos fenólicos foram removidos do soro do leite pela adição de PVPP na concentração de 10 mg/ml. A mistura foi mantida em temperatura ambiente por três horas, com agitação a cada 30 minutos. Em seguida, foi centrifugada a 15.000 rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado com filtro de

membrana 0,22 μm PTFE e as medidas feitas de acordo com o procedimento de Folin–Ciocalteu. A concentração dos compostos fenólicos no soro do leite foi determinada pela diferença da leitura antes e depois do tratamento com PVPP, e os resultados foram expressos como equivalente ácido gálico (EAG; mg/L de leite).

O conteúdo de flavonoides das amostras de leite foi determinado por espectrofotometria, com leitura a 425 nm, após reação com cloreto de alumínio como descrito por Woisky & Salatino (1998) e modificado por Sánchez et al. (2010). Uma alíquota de 100 μl do extrato foi misturada com 50 μl de cloreto de alumínio (5%, v/v) e 850 μl de metanol (90%, v/v). As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos antes da leitura. Os resultados foram expressos como equivalente quercetina (EQ; mg/l de leite).

O poder de redução total das amostras de leite foi determinado como descrito por Zhu et al. (2002), com algumas modificações. As proteínas do leite foram precipitadas pela adição de um mL de uma solução 20% (v/v) de ácido tricloroacético (TCA) para um mL de leite. A mistura foi agitada por 10 minutos e centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos a 20°C. A absorbância foi medida a 700 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Spectrum SP2000) e o poder de redução expresso como equivalente ácido gálico (EAG; mg/L de leite).

A análise da capacidade antioxidante pela captura de radicais livres foi realizada pelo método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), que avalia a capacidade antioxidante da amostra medindo sua habilidade em proteger a fluoresceína da oxidação pelo 2,2'-azobis-(2-amidinopropano)-dicloridrato (AAPH), como descrito por Zulueta et al. (2009), com algumas modificações.

Após descongelamento, as amostras foram homogeneizadas em banho-ultrassom e diluídas em balão volumétrico de 50 mL com tampão fosfato na proporção de 1:1000 (v/v).

Foram adicionados nas microplacas 25 μL das soluções contendo as amostras de leite preparadas anteriormente, ou tampão fosfato como branco ou solução Trolox[®] (ácido(±)-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), que foi utilizada para compor a curva de calibração. Em seguida, foram adicionados 150 μL da solução de fluoresceína a 4,0 nmol/L, preparada a partir de uma solução estoque (1,0 mmol/L). Após cinco minutos de ambientação das soluções a 37°C sob proteção da luz, foram adicionados 25 μL da solução de AAPH a 160 mmol/L (dihidrocloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)). Iniciou-se imediatamente a leitura de intensidade

da fluorescência, sendo o comprimento de onda de excitação e emissão, 485 nm e 515 nm, respectivamente. As leituras foram feitas em espectrofluorímetro PerkinElmer modelo VICTOR X4 a intervalos de um minuto durante 30 minutos. Todo o procedimento foi conduzido a 37°C e um tampão fosfato de potássio (pH 7,0) foi usado como solvente.

Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol/L}$ equivalente Trolox[®] (ET), sendo calculados pela equação da reta obtida pela curva de calibração com o padrão Trolox[®] ($r^2 = 0,984$):

$$y = 0,3635 + 0,8547x,$$

em que x é o valor de ORAC expresso em $\mu\text{mol ET/L}$ e y é a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência (AUC) da amostra ou padrão, menos a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência do branco, sendo que a AUC pode ser calculada pela equação:

$$\text{AUC} = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{n+1}/f_0),$$

em que f_0 é a intensidade inicial da fluorescência e f_n é a intensidade da fluorescência no tempo n .

A produção de hidroperóxidos dienos conjugados (DC) foi usada para medir a oxidação dos lipídios como descrito por Kiokias et al. (2006). Foram adicionados 50 μL de leite a 2,5 mL de uma solução 2:1 isooctano/2-propanol (v/v) e agitados por um minuto. As amostras foram filtradas em filtro de membrana 0,22 μm PTFE (Spritzen, Shanghai, China) e a absorbância foi determinada com espectrofotômetro UV-Vis. As concentrações de DC nas amostras de leite foram calculadas pelo monitoramento da absorbância a 232 nm e usando a absorvidade molar do ácido linoleico ($e = 27,000$).

- Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado foi o quadrado Latino 4 x 4, com quatro tratamentos, quatro vacas e quatro períodos experimentais. As variáveis avaliadas foram submetidas a análise de variância segundo o segundo modelo estatístico:

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

em que: Y_{ijk} = variáveis observadas, μ = média geral; A_i = efeito do animal i , variando de 1 a 4; P_j = efeito do período j , variando de 1 a 4; T_k = efeito do

tratamento k , variando de 1 a 4; e_{ijk} = erro aleatório. Todos os efeitos foram considerados fixos, exceto o efeito de animal que foi considerado aleatório.

Os dados foram interpretados por meio de análise de variância usando o procedimento PROC MIXED do SAS (*Statistical Analysis System, versão 9.2. - 2001*) e as diferenças entre as médias dos tratamentos foram determinadas pelo teste de Tukey considerando 0,05 o grau de significância.

Resultados e discussão

O local de administração do PBP e do óleo de soja não teve efeito ($P>0,05$) sobre a produção (kg/dia) e produção de leite corrigida para 4% de gordura (Tabela 3). A produção de leite também não foi alterada pela suplementação da dieta de vacas leiteiras com 5% óleos vegetais ricos em ácido linoleico ou α -linolênico (He & Armentano, 2011) ou pela perfusão abomasal de 400 g/dia de óleo de soja em vacas no início e meio da lactação (Benson et al., 2001).

Os tratamentos não tiveram efeito ($P>0,05$) sobre a concentração e produção de proteína e lactose. Outros trabalhos evidenciaram que a suplementação da dieta de vacas leiteiras com outras fontes de óleos vegetais como girassol, linhaça e canola também não mostraram efeito sobre o conteúdo de proteína do leite (He & Armentano, 2011; Bu et al., 2007; Bell et al., 2006). Segundo Jenkins & McGuire (2006) o percentual de proteína pode apresentar pequenas respostas a mudanças na composição dietética, o conteúdo de lactose é raramente modificado e a gordura é o componente do leite mais sensível a manipulação da dieta.

Houve efeito ($P<0,05$) do local de administração do óleo de soja para o percentual e produção (kg/dia) de gordura do leite e a concentração de sólidos totais. A perfusão abomasal de óleo reduziu em 33% o teor de gordura no leite, independentemente da presença da própolis. Este comportamento pode ser explicado pelo perfil de AG que chegou ao intestino, pois segundo Shingfield & Griinari (2007) a depressão da gordura do leite está associada com a fonte e não com a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) suplementados na dieta de vacas leiteiras. Portanto, a elevada concentração de AGPI de cadeia longa, especialmente o 18:2n-6, encontrado no óleo de soja resultou em menor produção de gordura no leite quando o óleo foi perfundido diretamente no abomaso.

Tabela 3 – Produção e composição química do leite de vacas recebendo perfusão de própolis e óleo de soja no rúmen ou no abomaso

	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
PL (kg/dia)	20,26	20,46	19,52	19,75	1,76	0,40
PLC (kg/dia) ²	19,26	17,07	15,73	19,13	1,68	0,07
	Concentração (%)					
Gordura	3,70a	2,94b	2,70b	3,81a	0,17	0,01
Proteína	3,19	3,24	3,27	3,27	0,12	0,60
Lactose	4,50	4,36	4,45	4,51	0,10	0,11
Sólidos totais	12,29a	11,33b	11,24b	12,48a	0,27	0,001
NUL (mg/dL) ³	14,26	13,16	13,02	13,41	0,74	0,65
CCS log10 ⁴	2,01	2,33	2,09	2,30	0,27	0,23
	Produção (kg/dia)					
Gordura	0,74a	0,59ab	0,53b	0,75a	0,07	0,04
Proteína	0,64	0,66	0,64	0,64	0,05	0,77
Lactose	0,92	0,90	0,87	0,89	0,09	0,22
Sólidos totais	2,48	2,32	2,20	2,45	0,21	0,06

¹Local da perfusão: RUM = rúmen, ABO = abomaso; ^aPrópolis e óleo no rúmen, ^bPrópolis e óleo no abomaso, ^cPrópolis no rúmen e óleo no abomaso, ^dPrópolis no abomaso e óleo no rúmen. ²PLC (kg/dia) = Produção de leite corrigida para 4% de gordura de acordo com equação do NRC (2001): $PLC = (0,4 \times \text{Produção leite (kg/dia)}) + [(15 \times (\text{Produção gordura} \times \text{Produção leite}/100))]$. ³NUL = Nitrogênio uréico no leite. ⁴CCSlog10 = Contagem de células somáticas.

Embora o aumento na concentração do *trans*-10 18:1, formado a partir da biohidrogenação no rúmen seja apontado como uma das causas para a depressão da gordura do leite (Bauman & Griinari, 2001), o efeito negativo sobre a produção e concentração da gordura está primeiramente associado com a utilização de óleos ricos em 18:2n-6 na forma desprotegida, pois o 18:2n-6 foi mais potente que o 18:1 e 18:3 em reduzir a produção de gordura no leite de vacas alimentadas com óleo de milho e girassol (He & Armentano, 2011). A depressão na gordura do leite também ocorreu em outros resultados de pesquisa quando vacas foram alimentadas com 6% de óleo de girassol (Bell et al., 2006) ou variações de 3,4 a 4% de óleo de soja (AlZahal et al., 2008; Dhiman et al., 2000), todos ricos em 18:2n-6.

O local de perfusão do PBP não interferiu no teor de gordura do leite quando óleo de soja foi administrado no rúmen (PR/OR e PA/OR), portanto, a administração ruminal de 63,04 mg/dia de flavonoides totais não foi suficiente para interferir no

metabolismo lipídico e alterar o perfil de AG resultantes da biohidrogenação ao ponto de interferir na síntese da gordura do leite.

Não houve efeito ($P>0,05$) do local de administração dos tratamentos para a concentração de nitrogênio ureico no leite (NUL). A concentração média de NUL no leite foi de 13,46 mg/dL, indicando adequado nível de proteína bruta na dieta e utilização eficiente do nitrogênio oriundo dessa proteína (Broderick et al., 1990), uma vez que valores de NUL acima de 16 mg/dL indicam deficiência na fermentação de carboidratos não fibrosos, excesso de proteína na dieta e/ou desequilíbrio entre a disponibilidade de energia e nitrogênio no rúmen (Grant, 2005).

A CCS não foi influenciada ($P>0,05$) pela perfusão ruminal ou abomasal do PBP. Estudos a respeito da aplicação da própolis no controle da mastite datam da década de 1980 e relatam sucesso no tratamento da enfermidade com o emprego de diferentes formas do produto (Meresta et al., 1989; Meresta & Meresta, 1985; Mirolyubov & Barskov, 1980). Mais recentemente, a atuação da própolis como composto natural antimicrobiano e seu potencial no combate ao *Staphylococcus aureus* (Saeki et al., 2011), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativos, e *Streptococcus agalactiae* (Pinto, et al., 2001), também foi evidenciada. No entanto, para estes estudos o produto foi aplicado *in loco* ou administrado em meios de cultura *in vitro*, e as concentrações avaliadas foram superiores a empregada neste estudo.

O local de administração do PBP e do óleo de soja influenciou ($P<0,05$) as concentrações dos AG de cadeia curta e média (Tabela 4). A perfusão abomasal do óleo (PA/OA e PR/OA) reduziu a concentração dos graxos de cadeia curta e média em relação a sua administração no rúmen. Porém, o local de perfusão do PBP não interferiu na concentração destes AG, independentemente da presença do óleo de soja.

A redução na concentração dos AG de cadeia curta e média pela perfusão abomasal do óleo pode ter ocorrido em função da diminuição na síntese *de novo*, já que a maior parte dos AG de quatro a 14 carbonos e a metade dos AG com 16 carbonos encontrados na gordura do leite é sintetizada *de novo* pelas células epiteliais da glândula mamária (Huang et al., 2008). Porém, esse mecanismo é influenciado pela suplementação com AGPI de cadeia longa (Grummer, 1991) e pela redução na disponibilidade de acetato e β -hidroxobutirato, resultantes da fermentação ruminal (Palmquist et al., 1993).

Tabela 4 – Composição em ácidos graxos da gordura do leite de vacas recebendo perfusão de própolis e óleo de soja no rúmen ou abomaso

mg/g de lipídios totais	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
4:0	7,47b	6,86b	7,45b	8,86a	0,283	0,012
6:0	8,15a	5,50b	7,50a	7,49a	0,396	0,014
8:0	6,74a	4,20b	3,64b	6,23a	0,414	0,003
10:0	18,35a	11,07b	5,68c	14,55ab	1,081	0,001
12:0	24,55a	16,39b	22,54a	15,02b	1,234	0,004
13:0	0,72	0,67	0,77	0,56	0,074	0,311
13:1n-5	1,33	1,37	1,58	1,35	0,115	0,458
14:0	83,03	72,75	69,64	87,15	4,078	0,066
14:1n-5	5,47a	2,48b	2,77b	5,09a	0,318	0,001
15:0	8,74a	7,79b	8,31ab	9,13a	0,344	0,012
15:1n-5	3,14	2,53	2,71	2,78	0,246	0,426
16:0	215,51ab	181,98b	201,64b	240,73a	8,266	0,011
16:1n-7	9,46a	4,70b	10,32a	8,89a	0,743	0,006
16:1n-5	3,69	3,08	3,61	3,72	0,175	0,078
17:0	3,63b	4,74a	4,85a	4,52a	0,153	0,005
17:1n-7	1,71	1,45	1,42	1,53	0,089	0,196
18:0	100,30b	109,15b	142,25a	124,75ab	6,623	0,011
18:1n-9t	20,08b	35,91a	21,06b	22,11b	1,328	0,001
18:1n-9c	251,47	223,77	263,74	240,66	13,668	0,298
18:2n-6c (LA) ²	16,44b	86,35a	88,45a	16,15b	4,758	<0,001
18:3n-3 (LNA) ³	1,56b	4,33a	5,03a	1,54b	0,185	<0,001
18:2n(9c,11t) (CLA) ⁴	6,58	7,23	7,07	6,97	0,540	0,849
18:2n(10t,12c) (CLA) ⁴	1,67a	1,10b	1,21b	1,42a	0,132	0,048
20:0	1,21b	2,95a	1,60b	1,43b	0,263	0,012
20:3n-6	0,72	0,70	0,80	0,83	0,054	0,264
20:4n-6	0,97	0,87	0,96	0,89	0,500	0,425
Somatório dos ácidos graxos						
AGMI ⁵	296,34	275,29	307,21	286,13	13,830	0,463
AGPI ⁶	27,93b	100,58a	104,02a	27,70b	4,941	<0,001
AGS ⁷	478,39a	422,06b	475,87a	520,39a	10,610	0,007
Sat:Insat	1,49a	1,13b	1,16b	1,66a	0,089	0,021
n-6	18,13b	87,91a	90,21a	17,87b	4,779	<0,001
n-3	1,56b	4,33a	5,03a	1,54b	0,185	<0,001
n-6/n-3	11,91b	20,55a	18,11a	11,70b	1,263	0,001

Diferentes letras na mesma linha são estatisticamente diferentes (P<0,05) pelo teste de Tukey. ¹Local da perfusão: RUM = rúmen, ABO = abomaso; ²Própolis e óleo no rúmen, ³Própolis e óleo no abomaso, ⁴Própolis no rúmen e óleo no abomaso, ⁵Própolis no abomaso e óleo no rúmen. ²LA = ácido linoleico, ³LNA = ácido linolênico, ⁴CLA = ácido linoleico conjugado, ⁵AGMI = soma dos ácidos graxos monoinsaturados, ⁶AGPI = soma dos ácidos graxos poli-insaturados, ⁷AGS = soma dos ácidos graxos saturados.

Sendo assim, o fornecimento de 63,04 mg/dia de flavonoides totais via PBP não foi suficiente para proteger os AGPI de cadeia longa da biohidrogenação ruminal, pois a maior concentração de AG de cadeia curta e média para os tratamentos em que o óleo foi administrado no rúmen (PR/OR e PA/OR) sugere que houve menos efeito dos AGPI sobre a síntese *de novo*. A redução na concentração de AG de cadeia curta na gordura do leite também foi verificada em outros estudos

quando dietas de vacas em lactação foram suplementadas com diferentes fontes e quantidades de óleos vegetais como óleo de soja (Huang et al., 2008) e linhaça (Bu et al., 2007).

O local de administração do PBP não alterou ($P>0,05$) as concentrações de 18:2n-6 e 18:3n-3 quando o óleo de soja foi administrado no rúmen (PR/OR e PA/OR) ou perfundido no abomaso (PA/OA e PR/OA). Estes resultados indicaram que o fornecimento de 63,04 mg de flavonoides/dia via PBP não foi suficiente para proteger os AG 18:2n-6 e 18:3n-3 da biohidrogenação ruminal.

Por outro lado, o local de administração do óleo alterou ($P<0,05$) as concentrações do 18:2n-6 e 18:3n-3, que foram maiores quando o óleo de soja foi perfundido no abomaso (PA/OA e PR/OA). Isto indica que grande parte destes AG foi biohidrogenada quando o óleo foi exposto a ação dos microrganismos no rúmen e que a secreção de 18:2n-6 e 18:3n-3 pela glândula mamária está relacionada com o fluxo intestinal destes isômeros.

A concentração do *cis*-9,*trans*-11 na gordura do leite não foi influenciada ($P>0,05$), pelo local de administração da própolis e do óleo, porém, o teor do *trans*-10,*cis*-12 foi reduzido ($P<0,05$) pela proteção do óleo contra a fermentação microbiana no rúmen (Abo/Abo e PR/OA). Segundo O'Donnell-Megaró et al. (2012), a concentração do ácido linoleico conjugado (CLA) na gordura do leite pode ser fortemente aumentada pela manipulação da dieta, porém, está sujeita às mudanças provocadas pela biohidrogenação e frequentemente está relacionada com a depressão da gordura do leite.

Apesar do aumento na concentração do *trans*-10,*cis*-12 na gordura do leite para os tratamentos em que o óleo de soja foi administrado no rúmen (PR/OR e PA/OR), foi a elevada concentração do 18:2n-6 e 18:3n-3 provocada pela perfusão abomasal de óleo que levou à depressão no teor e na produção de gordura no leite (Tabela 3). Este resultado está de acordo com o determinado por He & Armentano (2011) quando suplementaram a dieta de vacas com diferentes fontes de óleos vegetais ricos em ácido linoleico e linolênico.

A redução na concentração do 18:2n-6 e 18:3n-3 observada para os tratamentos em que o óleo foi administrado no rúmen, não influenciou a concentração do *cis*-9,*trans*-11 mas aumentou a concentração do *trans*-10,*cis*-12. Portanto, é provável que a administração ruminal do PBP na presença do óleo tenha evitado a formação destes isômeros do CLA, ou que a ação microbiana sobre o

18:2n-6 e 18:3n-3 no rúmen tenha resultado na formação de outros produtos intermediários da biohidrogenação não identificados neste estudo.

A concentração total dos ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) não foi alterada ($P>0,05$) pelos tratamentos, porém, a perfusão abomasal do óleo (Abo/Abo e PR/OA) aumentou em 3,7 vezes a concentração de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e reduziu ($P<0,05$) a concentração dos ácidos graxos saturados (AGS) (Tabela 4). Este resultado pode ser atribuído a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados pela microbiota ruminal, e a elevação no fluxo intestinal de AGPI decorrentes da perfusão abomasal do óleo de soja.

A concentração de AGPI na gordura do leite não diferiu entre os tratamentos em que o óleo de soja foi administrado no rúmen com ou sem o PBP (PR/OR e PA/OR). Além disso, os resultados observados para a razão entre os ácidos graxos saturados:insaturados, concentração de ômega 3, concentração de ômega 6 e razão n-6:n-3 não foram influenciados pela presença do PBP e estão relacionados ao local de administração do óleo. Sendo assim, a administração ruminal de 63,04 mg de flavonoides/dia não protegeu os ácidos graxos insaturados contra a biohidrogenação e, portanto não foi capaz de contribuir para a redução da concentração de AGS e aumentar a composição em AGPI.

Embora seja conhecidamente uma fonte rica em compostos com ação antioxidante, o local de administração da própolis não influenciou ($P>0,05$) as concentrações de compostos fenólicos e a atividade antioxidante no leite. Porém, a perfusão abomasal de óleo alterou ($P<0,05$) a estabilidade oxidativa determinada pela concentração de dienos conjugados no leite (Tabela 5).

O conteúdo de flavonoides totais e polifenóis quantificados no leite de vacas que receberam a própolis via administração ruminal (PR/OR e PR/OA), não foi diferente ($P>0,05$) de quando o aditivo foi perfundido no abomaso (Abo/Abo e PA/OR). Dados a respeito da transferência de compostos com atividade antioxidante da dieta para o leite de vacas suplementadas com PBP não estão disponíveis na literatura. Além disso, pouco se conhece a respeito do metabolismo de flavonoides e ácidos fenólicos no rúmen.

A biodisponibilidade da quercetina foi determinada por Berger et al. (2012) após a administração ruminal deste flavonoide na forma aglicona e glicosilada a vacas não lactantes. Os autores verificaram por meio da quantificação destes compostos no plasma, que a biodisponibilidade absoluta da quercetina foi de 0,5%

para a forma glicosilada e 0,1% para a aglicona. A transferência compostos com ação antioxidante presentes na dieta de ruminantes como o α -tocoferol e β -caroteno também é relativamente baixa. Havemose et al. (2006) estimaram que a transferência α -tocoferol e β -caroteno da dieta para o leite foi de apenas 8,6% e 6,8%, respectivamente, para vacas alimentadas com silagem de trevo.

Tabela 5 – Concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante do leite de vacas recebendo perfusão de própolis e óleo de soja no rúmen ou no abomaso

	Tratamentos ¹				EPM	P
	PR/OR ^a	PA/OA ^b	PR/OA ^c	PA/OR ^d		
Flav. Totais (mg EQ/L)	0,310	0,207	0,266	0,221	0,064	0,678
Polifenóis (μ g EAG/mL)	5,118	4,302	4,208	4,741	0,473	0,515
Red. Fe (μ g/mL)	15,251	18,409	15,718	16,974	2,751	0,376
ORAC (μ mol ET)	7915,88	7665,98	8774,81	8919,88	736,74	0,418
DC (mmol/kg gordura)	41,55b	71,96a	78,90a	40,88b	5,054	0,001

Diferentes letras na mesma linha são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. ¹Local da perfusão: RUM = rúmen, ABO = abomaso; ^aPrópolis e óleo no rúmen, ^bPrópolis e óleo no abomaso, ^cPrópolis no rúmen e óleo no abomaso, ^dPrópolis no abomaso e óleo no rúmen.

A atividade antioxidante no leite, determinada por meio do poder de redução do ferro e por captura radicalar (ORAC), não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Porém, a adição de PBP em quantidade semelhante a avaliada neste estudo, melhorou o perfil oxidativo do leite (Aguiar, 2012).

Um dos fatores que pode ter determinado a ausência de efeito na transferência de antioxidantes da dieta para o leite e sua ação na proteção dos AGPI é a quantidade de flavonoides e ácidos fenólicos presentes no produto avaliado. Segundo Manach et al. (2004) os efeitos dos polifenóis dependem da quantidade ingerida e sua biodisponibilidade, sendo que esta pode ser muito variável.

Cottica et al. (2011) analisaram produtos à base de própolis análogos ao utilizado neste estudo e observaram alta atividade antioxidante mesmo quando em baixas concentrações. No entanto, apesar de ação antioxidante e antimicrobiana ser frequentemente atribuída aos flavonoides e demais constituintes fenólicos da própolis (Bankova, 2005), a necessidade de mais conhecimento a respeito da biodisponibilidade dos flavonoides é destacada por Berger et al. (2012) como pré-

requisito para determinar seu potencial para exercer efeitos biológicos, especialmente com respeito a interpretação de dados obtidos a partir de experimentos *in vitro*.

A concentração de peróxidos dienos conjugados (DC) foi aproximadamente 83% superior para as vacas que receberam perfusão abomasal de óleo de soja (Abo/Abo e PR/OA). O aumento na concentração de AGPI verificado pela perfusão abomasal do óleo levou ao aumento na concentração de DC, uma vez que os AGPI são mais suscetíveis às reações de oxidação e a formação hidroperóxidos (Kristensen et al., 2004). A concentração de DC não diferiu entre os tratamentos em que o óleo foi perfundido no abomaso acompanhado ou não do PBP, indicando que os componentes antioxidantes da própolis perfundidos no abomaso não foram capazes de proteger os AGPI da gordura do leite contra as reações de oxidação lipídica.

Conclusão

A perfusão abomasal do óleo de soja reduz a concentração de ácidos graxos saturados e aumenta a concentração ômega 3, ômega 6 e a concentração de ácidos graxos poli-insaturados na gordura do leite. Porém, o local de administração do produto à base de própolis não tem efeito sobre a transferência de compostos fenólicos e não melhora a atividade antioxidante e a estabilidade oxidativa do leite. Portanto, o rúmen tem papel decisivo no metabolismo lipídico e determina o perfil de ácidos graxos da gordura do leite, mas não tem influência sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

Referências

- AGUIAR, S.C. **Quantificação e caracterização dos compostos ativos da própolis e seus efeitos sobre a nutrição e qualidade do leite de vacas e cepas bacterianas do rúmen**. 2012. 132f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- ALZAHAL, O.; ODONGO, N.E.; MUTSVANGWA, T.; et al. Effects of Monensin and Dietary Soybean Oil on Milk Fat Percentage and Milk Fatty Acid Profile in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.1166-1174, 2008.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 15.ed. Virginia, Washington: Arlington, 1990. 1298p.
- BANKOVA, V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.114-117, 2005.
- BAUMAN, D.L.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p.15-29, 2001.
- BELL, J.A.; GRIINARI, J.M.; KENNELLY, J.J. Effect of safflower oil, flaxseed oil, monensin, and vitamin E on concentration of conjugated linoleic acid in bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 733–748, 2006.
- BENSON, J.A.; REYNOLDS, C.K.; HUMPHRIES, D.J. et al. Effects of abomasal infusion of long-chain fatty acids on intake, feeding behavior and milk production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1182–1191, 2001.
- BERGER, L.M.; WEIN, S.; BLANK, R. et al. Bioavailability of the flavonol quercetin in cows after intraruminal application of quercetin aglycone and rutin. **Journal of Dairy Science**, v.95, p.5047–5055, 2012.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BRODERICK, G.A.; RICKER, D.B.; DRIVER, L.S. Expeller soybean meal and corn by-products versus solvent soybean meal for lactating dairy fed alfalfa as sole forage. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.453-462, 1990.
- BU, D.P.; WANG; J.Q.; DHIMAN, T.R. et al. Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.998–1007, 2007.
- COTTICA, S.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; EBERLIN, M.N. et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, n.5, p.929-935, 2011.
- DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets in linoleic acid. **Journal of Dairy Science**, 8v.3. p.1016-1027, 2000.
- FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE, S.G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1, p.497-509, 1957.
- FRANCO, S. L.; BUENO, J. H. F. Otimização de processo extrativo de própolis. **Infarma**, v.11, n.11/12, p.48-51, 1999.
- GRANT, R.J. Optimizing starch concentrations in dairy rations. In: ANNUAL TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 14., 2005, Fort Wayne. Proceedings... Fort Wayne, 2005. p.73-79.
- GRESSLEY, T.F.; REYNAL, S.M.; OLMOS COLMENERO, J.J. Technical Note: Development of a Tool to Insert Abomasal Infusion Lines into Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3965-3967, 2006.

- GRUMMER, R.R.; CARROLL, D.J.; Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *Journal of Animal Science*. v.69, p.3838-3852, 1991.
- HAN, J.; BRITTEN, M.; ST-GELAIS, D. et al. Polyphenolic compounds as functional ingredients in cheese. *Food Chemistry*, v.124, p.1589-1594, 2011.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C. A Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, v.22, p.475-476, 1973.
- HAVEMOSE, M.S.; WEISBJERG, M.R.; BREDIE, W.L.P.; et al. Oxidative Stability of Milk Influenced by Fatty Acids, Antioxidants, and Copper Derived from Feed. *Journal of Dairy Science*, v.89, p.1970–1980, 2006.
- HE, M. & ARMENTANO, L.E. Effect of fatty acid profile in vegetable oils and antioxidant supplementation on dairy cattle performance and milk fat depression. *Journal of Dairy Science*, v.94, p.2481–2491, 2011.
- HUANG ,Y.; SCHOONMAKER, J.P.; BRADFORD, B.J. et al. Response of Milk Fatty Acid Composition to Dietary Supplementation of Soy Oil, Conjugated Linoleic Acid, or Both. *Journal of Dairy Science*, v.91, p.260–270, 2008.
- JENKINS, T.C.; MCGUIRE, M.A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. *Journal of Dairy Science*, v.89, n.4, p.1302–1310, 2006.
- JOSEPH, J. D. & ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of Association of Official Analytical Chemical International*, v.75, n.3, p.488-506, 1992.
- KIOKIAS, S.N.; DIMAKOU, C.P.; TSAPROUNI, I.V.; OREOPOULOU, V. Effect of Compositional Factors against the Thermal Oxidative Deterioration of Novel Food Emulsions. *Food Biophysics*, v.3, p.115-123, 2006.
- KRISTENSEN, D.; HEDEGAARD, R.V.; NIELSEN, J.H. et al. Oxidative stability of buttermilk as influenced by the fatty acid composition of cows' milk manipulated by diet. *Journal of Dairy Research*, v.71, p.46–50, 2004.
- LASKAR, R.A.; SK, I.; ROY, N. et al. Antioxidant activity of Indian propolis and its chemical constituents. *Food Chemistry*, v.122, p. 233–237, 2010.
- LINDMARK-MANSSON, H. & AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. *British Journal of Nutrition*, v.84 (Suppl. 1), p.103–110, 2000.
- LOURENÇO, M.; RAMOS-MORALES, E.; WALLACE, R.J. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, v.4, n.7, p. 1008–1023, 2010.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.79, p.727-747, 2004.
- MERESTA, L.; MERESTA, T.; BURDZINSKI, J. et al. Treatment of mastites in cows using an extract of propolis. *Medycyna Weterynaryjna*, v.45, n.7, p.392-395, 1989.
- MERESTA, L. & MERESTA, T. Antibacterial activity of flavonoid compounds of propolis, occurring in flora in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.28, n.1, p.61-63, 1985.
- MIROLYUBOV, M.G.; BARSKOV, A.A. Propolis for bovine mastitis. *Medycyna Veterinariya*, n.2, p.45-46, 1980.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.ed. Washington, D.C.: National Academy Press, 2001. 381p.

- MAIA, E.L. & RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.53, p.27-35, 1993.
- O'DONNELL-MEGARO, A.M.; CAPPER, J.L.; WEISS, W.P.; BAUMAN, D.E. Effect of linoleic acid and dietary vitamin E supplementation on sustained conjugated linoleic acid production in milk fat from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.95, n.12, p.7299-7307, 2012.
- PINTO, M.S.; FARIA, J.E.; MESSAGE, D. et al. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.38, n.6, p.278-283, 2001.
- SAEKI, E.K.; PEIXOTO, E.C.T.M.; MATSUMOTO, L.S. et al. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. **Acta Veterinária Brasileira**, v.5, n.3, p.284-290, 2011.
- SÁNCHEZ, N.; MIRANDA, S.; VIT, P. et al. Propolis protects against oxidative stress in human saliva. **Journal of ApiProduct & ApiMedical Science**. v.2, p.72-76, 2010.
- SHINGFIELD, K. J.; GRIINARI, J. M. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.799–816, 2007.
- SHINGFIELD, K.J.; CHILLIARD, Y.; TOIVONEN, V. et al. Trans fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. **In Bioactive Components of Milk. Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.606, p.3–65, 2008.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.
- VISENTAINER, J.V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v.35, n. 2, p.274-279, 2012.
- VISENTAINER, J.V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v.35, n. 2, p.274-279, 2012.
- VOLTOLINI, T.V., SANTOS, G.T., ZAMBOM, M.A. Influencia dos estadios de lactacao sobre a contagem de celulas somaticas do leite de vaca da raza holandesa e identificacao de patogenos causadores de mastite no rebanho. **Acta Scientiarum**, v.23, p.961-966, 2001.
- WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v.37, p.99–105, 1998.
- ZHU, Q.Y.; HACKMAN, R.M.; ENSUNSA, J.L.; et al. Antioxidative Activities of Oolong Tea. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, p.6929-6934, 2002.
- ZULUETA, A.; MAURIZI, A.; FRÍGOLA, A. et al. Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. **International Dairy Journal**, v.19, p.380–385, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fermentação ruminal é influenciada pelos compostos fenólicos encontrados no produto a base de própolis e a quantidade fornecida em dietas de vacas em lactação interfere na digestibilidade dos nutrientes.

O fornecimento de 37 a 63 mg de flavonoides totais/dia é suficiente para melhorar a digestibilidade dos nutrientes. No entanto, estas quantidades são insuficientes para alterar a composição em ácidos graxos e melhorar a qualidade da gordura do leite.

O aumento no consumo de compostos fenólicos é acompanhado pelo aumento da atividade antioxidante no leite e o metabolismo ruminal parece não interferir na ação destes compostos. Portanto, é possível preservar a qualidade da gordura do leite a partir do fornecimento de produto a base de própolis nas dietas de vacas em lactação. Isto traria benefícios para a manutenção da qualidade do leite e, possivelmente, para a saúde dos consumidores.