



Efeito do extrato de própolis sobre a fermentação ruminal e produção de metano *in vitro*

Amr Salah Morsy^{1,2}, Yosra Ahmed Soltan^{1,3}, Sobhy Mohamed Abdallah Sallam³, Rafael Canonenco de Araujo⁴, Severino Matias de Alencar⁵, Adibe Luiz Abdalla¹

¹Laboratório de Nutrição Animal, CENA/USP, Piracicaba-SP. email: abdalla@cena.usp.br

²Animal Production Research Institute, Dokki, Giza, Egypt

³Animal Production Department, Faculty of Agriculture, Alexandria University, Egypt

⁴Departamento de Zootecnia, ESALQ/USP, Piracicaba-SP

⁵Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ/USP, Piracicaba-SP

Resumo: A própolis apresenta atividade antimicrobiana, o que pode afetar positivamente a fermentação ruminal. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de dois extratos de própolis (origem brasileira e egípcia) sobre a fermentação ruminal e a produção de metano *in vitro*. As concentrações utilizadas foram 0, 125, 250 e 500 µg/75 mL de fluido ruminal tamponado. A monon sódica (MON) à 3µM foi usada como controle positivo. Empregou-se a técnica semi-automática de produção de gás *in vitro*, sendo a incubação realizada à 39°C por 24h em frascos de vidro (160 mL) com 0,5 g de substrato, e 50 mL de meio de incubação e 25 mL de inóculo. Comparada ao controle negativo (dieta sem aditivos), MON reduziu a produção de gás e a produção de metano sem afetar a degradabilidade verdadeira da matéria seca (DVMS) ou matéria orgânica (DVMO) além de maior quantidade de matéria orgânica degradada por mL de gás produzido quando comparada ao controle (5,51 x 4,02), o que é indicativo de maior eficiência de síntese microbiana. Em contraste com o controle negativo, tanto o extrato de própolis Brasileiro quanto o Egípcio não afetaram ($P > 0,05$) a produção de gás com exceção quando se utilizou 250 µg de própolis Brasileiro. Não houve efeito significativo da inclusão do extrato de própolis na produção de metano exceto 125µg de própolis Egípcio, que reduziu ($P < 0,05$) a produção de metano, sem a redução da degradação da matéria seca e da matéria orgânica. Pode-se concluir que tanto o própolis Brasileiro quanto o Egípcio podem ser potenciais agentes de mitigação de metano, sem efeitos negativos na digestibilidade da matéria orgânica, mesmo com o uso de grandes concentrações de extrato de própolis.

Palavras-chave: degradação ruminal, metano, monensina, produção de gás, própolis

Effect of propolis extract on *in vitro* rumen fermentation and methane production

Abstract: Rumen inoculum enriched with particle-associated microorganisms was collected from six rumen cannulated Santa Inês wethers grazing tropical grass pasture and a supplement based on ground corn and soybean before feeding and used to evaluate effects of Brazilian and Egyptian propolis supplementation on ruminal fermentation and methane emission in short-term *in vitro*. The propolis was extracted by ethanol 70%. Propolis extracts concentration were defined as: 0, 125, 250, and 500 µg/75 mL of buffered rumen fluid. Sodium monensin (MON) at 3 µM was used as a positive control. It was used the semi-automatic *in vitro* gas production technique. Incubation was performed at 39°C for 24h in glass flasks (160 mL) with 0.5 g of substrate + 50 mL of medium + 25 mL of inoculum. Compared with negative control (diet without additives), MON reduced gas and methane productions without effects on truly degraded dry matter (TDDM) or truly degraded organic matter (TDOM) and improved the amount of degraded organic matter per mL of gas produced (PF - 5.51 vs. 4.02), indicating a greater microbial synthesis efficiency. Contrasting with negative control, either Brazilian or Egyptian propolis extracts did not affect ($P > 0.05$) gas production except when using 250µg of Brazilian propolis. There was no significant effect of the propolis extracts inclusion on methane production except for 125µg of Egyptian propolis which reduced ($P < 0.05$) methane production without reduction in dry or organic matter degradation. There was no significant effect of the propolis extracts on the mean values of the partitioning factor and ammonia concentration. It is concluded that both Brazilian and Egyptian propolis might be promising methane mitigation agents without negative effect on the organic matter digestibility with greater concentrations of the propolis extracts.



Keywords: gas production, methane, monensin, propolis, ruminal degradation

Introdução

Os antibióticos ionofóricos (ex: monensina sódica) são os principais aditivos comercialmente utilizados na manipulação da fermentação ruminal. Todavia, a União Européia desde 2006 banuiu o uso dessas substâncias como promotoras de crescimento animal. Cresce o interesse por substâncias antimicrobianas derivadas de plantas ou animais que mimetizem os efeitos ruminais dos ionóforos e, ao mesmo tempo, sejam bem aceitas pela sociedade consumidora.

Dentre os vários efeitos biológicos e farmacológicos da própolis, destaca-se sua atividade antimicrobiana (Bankova et al., 2005), atribuída principalmente à presença de flavonóides (Salomão et al., 2004). O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito de dois extratos de própolis (origem brasileira e egípcia) sobre a fermentação ruminal e a produção de metano *in vitro*.

Material e Métodos

Esta pesquisa foi conduzida no Laboratório de Nutrição Animal, CENA/USP, Piracicaba-SP. Os extratos de própolis obtidas no Brasil e no Egito foram produzidos via extração com etanol 70% à 42°C em rotoevaporador e seguido de liofilização. Para cada extrato de própolis, foram utilizadas quatro concentrações, sendo: 0; 125; 250 e 500 µg/75 mL de fluido ruminal tamponado. Como controle positivo utilizou-se a monensina sódica (MON; Sigma Aldrich Inc) na concentração de 3 µM. A ração sem a adição dos aditivos foi considerada como controle negativo.

A ração utilizada (moída a 1 mm) era composta por 50% de feno de Tifton, 32,7% de milho moído, 15% de farelo de soja, 1,3% de mistura mineral e 1% de calcário na base seca da ração (92,4% MS; 13,1% PB; 2,0% EE; 71,8% FDN; 34,3% FDA). Como doadores de inóculo foram utilizados seis carneiros (50 kg de PV) fistulados no rúmen e mantidos em pastagem e suplementados com mistura de milho moído, farelo de soja e mistura mineral (350 g/dia por animal; 20% PB).

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás adaptada ao sistema semi-automático do LANA para avaliação da produção de metano *in vitro* (Bueno et al., 2005 e Longo et al., 2006). A incubação foi realizada à 39°C por 24h em frascos de vidro (160 mL) com 0,5 g de substrato, 50 mL de meio de incubação e 25 mL de inóculo. A pressão das garrafas foi mensurada às 6, 12 e 24h de incubação utilizando-se transdutor de pressão com concomitante colheita de gás para determinação da concentração de metano. Após cada colheita, a pressão interna foi aliviada e as garrafas agitadas manualmente. O volume de gás foi calculado por equação de regressão definida para as condições locais. Foram utilizadas quatro garrafas para cada substrato e quatro garrafas contendo somente inóculo (branco) para correções e três inóculos diferentes.

A fermentação foi interrompida após 24h colocando-se as garrafas em gelo. A DVMS foi determinada adicionando-se 70 mL de solução detergente neutro por garrafa, secagem e filtragem em cadinho. A DVMO foi obtida incinerando-se o resíduo. A relação entre DVMO (mg) e a produção total de gás (mL) em 24h foi utilizada como índice de eficiência de síntese e microbiana (PF: fator de partição Blümmel et al., 1997). A concentração de metano foi determinada em cromatógrafo gasoso Shimadzu 2014 com coluna "Shincarbon ST micro packed" à 60°C e detector FID à 240°C. As amostras do líquido ruminal para análise das concentrações de amônia (NH₃) foram colocadas em tubos pela técnica descrita por Preston, (1995). Os dados foram analisados pelo PROC GLM do SAS (2002) utilizando-se análise de variância. As diferenças entre tratamentos foram obtidas pelo teste de Duncan com $P \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Os resultados referentes à adição de monensina ou extratos de própolis brasileira ou egípcia sobre a fermentação ruminal são apresentados na Tabela 1. O tratamento MON reduziu a produção de gás ($P < 0,01$) e a produção de metano ($P < 0,001$) sem apresentar efeitos negativos sobre a DVMS e a DVMO. Como consequência, o fator de partição foi maior para MON (5,51 mg MO_{degradada}/mL gás) em comparação ao controle (4,02 mg MO_{degradada}/mL gás). Em contraste com o controle, tanto o extrato de própolis Brasileiro quanto o Egípcio não afetaram ($P > 0,05$) a produção de gás com exceção quando se utilizou 250 µg de própolis Brasileiro. Não houve efeito significativo da inclusão do extrato de própolis na produção de metano exceto pelo primeiro nível de própolis Egípcio, que reduziu ($P < 0,05$) a produção de metano, sem a redução da degradação da matéria seca e da matéria orgânica. Não houve



efeito significativo do extrato de própolis nos valores médios de fator de partição e concentração de amônia.

Tabela 1 Efeito da monensina sódica (3µM) e das inclusões (125; 250 e 500 µg/75 mL de fluido ruminal tamponado) dos extratos de própolis brasileira e egípcia sobre a fermentação ruminal e a produção de metano *in vitro*.

Variáveis ¹	Tratamentos ^{2,3}								EPM ⁴
	CTL	MON	Própolis (Brasil)			Própolis (Egito)			
			125	250	500	125	250	500	
Gás, mL/g MS _{incubada}	155 ^a	115 ^c	148 ^a	143 ^b	146 ^a	145 ^a	149 ^a	147 ^a	5,2
CH ₄ , mL/g MS _{incubada}	17,9 ^a	7,9 ^b	15,9 ^a	17,5 ^a	15,4 ^a	13,9 ^{ab}	14,1 ^{ab}	14,6 ^a	2,2
CH ₄ , mL/g MO _{degradada}	25,8 ^a	14,8 ^c	22,3 ^{ab}	24,4 ^{ab}	21,7 ^{ab}	18,9 ^{bc}	19,8 ^{abc}	20,7 ^{ab}	3,0
DVMS, g/kg	665	683	701	708	699	698	694	679	33,7
DVMO, g/kg	694	694	715	721	713	733	705	702	27,0
FP, mg MO _{degradada} /mL gás	4,02 ^a	5,51 ^b	4,45 ^a	4,60 ^{ab}	4,45 ^a	4,54 ^a	4,29 ^a	4,32 ^a	0,32
pH final	6,74 ^a	6,72 ^{ab}	6,70 ^{ab}	6,69 ^{ab}	6,72 ^{ab}	6,71 ^{ab}	6,71 ^{ab}	6,63 ^b	0,04
Ammonia, mg/100mL	25,1	24,1	24,4	25,7	24,4	23,5	25,1	23,8	1,10

¹MS_{incubada} = matéria seca incubada; MO_{degradada} = matéria orgânica degradada; CH₄ = metano; DVMS = degradabilidade verdadeira da matéria seca; DVMO = degradabilidade verdadeira da matéria orgânica; FP = fator de partição (indicativo de eficiência microbiana).

²CTL = tratamento controle, sem adição de monensina ou própolis; MON = tratamento controle positivo contendo monensina sódica à 3µM; Tratamentos própolis brasileira e egípcia definidos pela inclusão de 125; 250 e 500 µg de extrato de própolis em 75 mL de fluido ruminal tamponado.

³Médias com letras distintas na mesma linha diferem entre si pelo teste de Duncan ($P < 0,05$).

⁴EPM = erro padrão da média.

Conclusões

Pode-se concluir que tanto o própolis Brasileiro quanto o Egípcio podem ser potenciais agentes de mitigação de metano, sem efeitos negativos na digestibilidade da matéria orgânica, mesmo com o uso de grandes concentrações de extrato de própolis

Agradecimentos

Ao CNPQ pelo financiamento do projeto, à Third World Academy of Sciences e à FAPESP pelas bolsas de estudo..

Literatura citada

Bankova, V. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 29-32, 2005.

Blümmel, M.; Makkar, H. P. S.; Becker, K. In vitro gas production: a technique revisited. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 77, n. 1, p. 24-34, 1997.

Bueno, I.C.S., Cabral Filho, S.L.S., Gobbo, S.P., Louvandini, H., Vitti, D.M.S.S., Abdalla, A.L., Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal Feed Science and Technology**, v.123-124, p.95-105, 2005.

Longo, C., Bueno, I.C.S., Nozella, E.F., Goddoy, P.B., Cabral Filho, S.L.S., Abdalla, A.L., The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, v.1293, p.62-65, 2006.

Preston, T.R. Biological and chemical analytical methods. In: Preston T.R. Tropical Animal Feeding: a manual for research workers. Rome:FAO, Chap.9 p.191-264, 1995.

Salomão, K.; Dantas, A. P.; Borba, C. M.; Campos, L. C.; Machado, D. G.; Aquino Neto, F. R.; Castro, S. L. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 87-92, 2004.