

## **EFEITO DA PRÓPOLIS DE ABELHAS AFRICANIZADAS EM MICROORGANISMOS DO LÍQUIDO RUMINAL**

*Joana Paula Nascimento Peixoto*

Zootecnista. M.Sc em Engenharia Agrícola pela Universidade Federal de Campina Grande. Av. Aprígio Veloso, 882. Campina Grande-PB CEP 58109-970. E-mail: jpaulapeixoto\_hotmail.com

*Adriana Evangelista Rodrigues*

Prof. Dr. da Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia-PB. E-mail:aerodrigues@yahoo.com

*Gláyciane Costa Gois*

Zootecnista. Mestranda em Zootecnia pelo PPGZ, Centro de Ciências Agrárias Universidade Federal da Paraíba Areia-PB. E-mail: glayciane\_gois@yahoo.com.br

**Resumo:** Objetivou-se neste trabalho avaliar o efeito dos extratos aquoso e alcoólico da própolis sobre a viabilidade dos protozoários do rúmen de bovino, como também verificar a ação destes extratos controlando o pH do líquido ruminal. Os extratos aquoso e alcoólico de própolis foram usados nas proporções de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%, adicionando-se 1ml de extrato em cada 4ml de líquido ruminal em tubos de ensaio, com três repetições cada. Foram realizadas aferições de pH na coleta do líquido ruminal e após 24 horas da aplicação. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado em um fatorial 2 x 12 (2 extratos e 12 concentrações) com três repetições. De acordo com os resultados conclui-se que in vitro, os extratos aquoso e alcoólico de própolis, nas diferentes concentrações, são passíveis de utilização no líquido ruminal por não alterar a viabilidade dos protozoários, não alterando o pH.

**Palavras-chave:** pH ruminal, própolis, protozoários ciliados

## **EFFECTO DE PROPÓLEOS DE ABEJAS AFRICANIZADAS EN LOS MICROORGANISMOS DEL RUMEN**

**Resumen:** El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la acuoso y alcohólico de los extractos de propóleos sobre la viabilidad de los protozoos del rumen de las especies bovina, así como para verificar la acción de estos extractos de controlar el pH del líquido ruminal. La experiencia se llevó a cabo en el CCA / UFPB. El humor acuoso y el grado alcohólico de los extractos de propóleos se utilizan en las proporciones de 0, 2, 4, 6, 8, 10%, añadiendo 1 ml de extracto en cada uno de 4 ml de líquido ruminal en tubos de ensayo, con tres repeticiones cada uno. La observación de pH se realizó en la colección del líquido ruminal y después de 24 horas de la aplicación del tratamiento. De acuerdo con los resultados que se puso fin a esa in vitro, el humor acuoso y el grado alcohólico de los extractos de propóleos, en las diferentes concentraciones, el uso que son posibles en el líquido ruminal para no alterar la viabilidad de los protozoos, que no alteran el pH.

**Palabras clave:** própolis, protozoos, el pH ruminal

## **EFFECT OF PROPOLIS OF AFRICANIZED BEES IN THE RUMEN MICROORGANISMS**

**Abstract:** The objective of this work was to evaluate the effect of the aqueous and alcoholic of the propolis extracts on the viability of the protozoa of the rumen of bovine, as well as to verify the action of these extracts controlling the pH of the liquid ruminal. The experience was accomplished in CCA/UFPB. The aqueous and alcoholic of propolis extracts were used in the proportions of 0, 2, 4, 6, 8, 10%, adding 1ml of extract in each 4ml of liquid ruminal in rehearsal tubes, with three repetitions each. The pH observation was accomplished in the collection of the liquid ruminal and after 24 hours of the application of the treatment. In agreement with the results it is ended that in vitro, the aqueous and alcoholic of propolis extracts, in the different concentrations, they are possible use in the liquid ruminal for not altering the viability of the protozoa, not altering the pH.

**Key words:** propolis, protozoa, rumen pH

## INTRODUÇÃO

Objeto de estudo em diversos países, a própolis, subproduto da apicultura, tem demonstrado importantes propriedades terapêuticas, como atividades antimicrobianas, antiinflamatórias e cicatrizantes. Essa atividade antimicrobiana ocorre pela inibição de bactérias classificadas como gram-positivas. Segundo Pinto (2000), foi constatada a inibição do crescimento de bactérias gram-positivas, responsáveis pela incidência de mastite em bovinos leiteiros. Entretanto, não há muitos relatos da aplicabilidade da própolis como aditivo nutricional para ruminantes e de seus efeitos sobre a população microbiana ruminal (STRADIOTTI JÚNIOR et al., 2004).

A comunidade microbiana que habita o ecossistema ruminal, é constituída por inúmeras estirpes bacterianas, por fungos e protozoários ciliados anaeróbicos. Esta simbiose permite que os ruminantes alimentem a sua comunidade microbiana com alimentos celulósicos e obtenham proteína e ácidos graxos de cadeia curta que são os produtos finais da fermentação dos alimentos (S'THIAGO, 2003). Com a ingestão de grande quantidade de carboidratos ocorre o acúmulo de líquido no interior do rúmen, comumente provocado pelos quadros de acidose láctica ruminal. Na forma aguda, a presença de grandes quantidades de ácido láctico altera sua osmolaridade e faz com que o organismo capte água dos tecidos e jogue-a no interior do rúmen. Os animais afetados, além da dilatação abdominal e dos sintomas gerais, podem apresentar dor e até sinais nervosos. O exame do suco de rúmen mostra um pH abaixo de 5,0 (GARCIA, 2002).

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar o efeito dos extratos aquoso e alcoólico da própolis sobre a viabilidade dos protozoários do rúmen de bovino, como também verificar a ação destes extratos controlando o pH do líquido ruminal.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Centro de Ciências Agrárias da UFPB. A própolis foi coletada de colméias de *Apis mellifera*, instaladas na área experimental do Setor de Apicultura do DZ/ CCA/ UFPB. Para a coleta foram colocadas telas plásticas entre as tampas e as melgueiras das colméias e após a propolização total, as telas foram retiradas e armazenadas em freezer durante 24 horas, para a remoção total da própolis e posterior elaboração dos extratos aquoso e alcoólico, seguindo-se a metodologia de Park et al. (1998). Os extratos foram preparados nas proporções de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%, e armazenados em vidros de cor âmbar por um período de 30 dias. As amostras de líquido ruminal foram coletadas segundo normas técnicas, sendo distribuídas em tubos de ensaio, na proporção de 4,0 mL, em triplicatas.

Inicialmente fez-se a aferição do pH de cada amostra adicionando, em seqüência, 1,0 mL do extrato referente a

cada tratamento. Os tubos de ensaio, sob anaerobiose, foram acondicionados em estufa a 39 °C, temperatura média no ambiente ruminal, e após um período de 24 horas foi realizada então uma nova aferição do pH de cada tratamento para a avaliação da resposta *In Vitro* do controle do pH do líquido ruminal realizada pela própolis.

Foram realizadas as seguintes análises: resposta *in vitro* do controle do pH do líquido ruminal alcançada pela própolis; ação da própolis sobre os protozoários presentes no líquido ruminal e determinação da melhor opção de uso entre as soluções alcoólica e aquosa de própolis. O experimento foi composto de dois tratamentos (Extrato aquoso – EAQ e Extrato alcoólico – EAL), 6 variações (0, 2, 4, 6, 8 e 10% de própolis) e 3 repetições (A, B e C) com 2 lâminas para leitura. Foi realizado o Delineamento Inteiramente Casualizado em um fatorial 2 x 12 (2 extratos e 12 concentrações).

A separação de ciliados de cada amostra iniciou-se pela centrifugação dos tubos de ensaio com o conteúdo ruminal e o extrato de cada tratamento durante 3 minutos a uma rotação de 1000xg, desprezando-se o sobrenadante após a centrifugação; no precipitado adicionou-se 4,0 mL de solução de sacarose a 30% deixando descansar 5 minutos e centrifugando novamente por 30 minutos a 1000 x g. Desprezou-se o sobrenadante. No precipitado foram feitas três lavagens com 5,0 mL de solução salina (soro fisiológico a 10%), centrifugando-se após cada lavagem durante três minutos a 1000 x g, e desprezando-se. O precipitado final obtido foi a fração de ciliados presentes nas amostras.

Para a contagem de ciliados utilizou-se a solução fixadora TBFS (Trypan Blue Formalin Saline) para colorir os ciliados viáveis e não viáveis, diferenciando-os. Esta solução foi acrescentada a cada precipitado dos tubos de ensaio na proporção de cinco partes de solução para cada parte da fração de ciliados, aguardando-se o tempo de 20 minutos para a preparação das lâminas. Após o tempo de 5 minutos, foram retirados 0,1 mL de cada amostra e colocados em lâmina para a leitura em microscópio. Em cada lâmina foram contados os ciliados presentes em dez campos observados, e os valores foram distribuídos na fórmula:  $N = 72 \times n \times d$ , em que: N = número de ciliados total em 1,0 mL; n = número de ciliados em dez leituras; d = objetiva usada nos campos de observação; 72 = constante.

O modelo estatístico utilizado foi:  $Y_{ijk} = \mu + E_i + C_j + (EC)_{ij} + R_k + e$ ; Em que:  $Y_{ijk}$  = valor observado do i-ésimo extrato na j-ésima concentração da k-ésima repetição;  $\mu$  = média geral; E = efeito do i-ésimo extrato; C = efeito da j-ésima concentração; R = efeito da k-ésima repetição; e = erro aleatório.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 refere-se as variações de pH quando aplicados extratos alcoólico e aquoso no líquido ruminal. Pelos resultados obtidos observa-se que a interação do extrato de própolis com o líquido ruminal produziu

alterações no valor de pH, no entanto, em nenhuma das concentrações utilizadas esta alteração produziu valores prejudiciais aos protozoários do líquido ruminal.

Tabela 1 - Variações do pH do líquido ruminal de bovinos sob o efeito de extratos aquoso e alcoólico de própolis em diferentes proporções.

Trat Leitura	Variações (%)	pH Coleta	pH
EAL	0	6,40	6,47
EAL	2	6,40	6,40
EAL	4	6,40	6,42
EAL	6	6,40	6,69
EAL	8	6,40	6,39
EAL	10	6,40	6,58
EAQ	0	6,40	6,10
EAQ	2	6,40	6,40
EAQ	4	6,40	6,25
EAQ	6	6,40	6,30
EAQ	8	6,40	6,88
EAQ	10	6,40	6,90

Tabela 2 - Resultados estatísticos do Delineamento Inteiramente Casualizado.

Variação	Pr > F
Extrato	0,4261
Concentração	0,6665
Extrato * Concentração	0,3657

Dentre os extratos utilizados, na figura 1, fica evidenciada a maior alteração causada pelo extrato aquoso de própolis nas proporções 8 e 10%, elevando o pH de coleta de 6,40 para 6,88 (8%) e 6,90 (10%) no pH de leitura. Para o extrato alcoólico, fica evidenciada a maior alteração para o nível 6%, que apresentou um pH de leitura de 6,69. Na comparação entre os valores de pH, observa-se que o extrato alcoólico foi o que apresentou em todas as concentrações valores próximos e acima do pH de coleta, enquanto que o extrato aquoso alterou o pH de coleta tanto para valores inferiores quanto para valores superiores.

A análise estatística para viabilidade de protozoários do líquido ruminal em contato com extratos aquoso e

alcoólico de própolis, não apresentou resultados significativos, quando se aplicou extratos nas concentrações 0, 2, 4, 6, 8 e 10%, indicando que houve manutenção das características do líquido ruminal, ou seja, mesmo aplicando-se extratos de própolis ao líquido ruminal, este manteve condições de vida aos protozoários. Isso pode ser explicado pela pequena alteração ocorrida nos valores de pH (figura 1).

Provavelmente a não alteração do pH, ocorrida *in vitro* poderá indicar que *in vivo* os extratos aplicados no líquido ruminal não terão efeito sobre a alteração físico-química e biológica do rúmen.

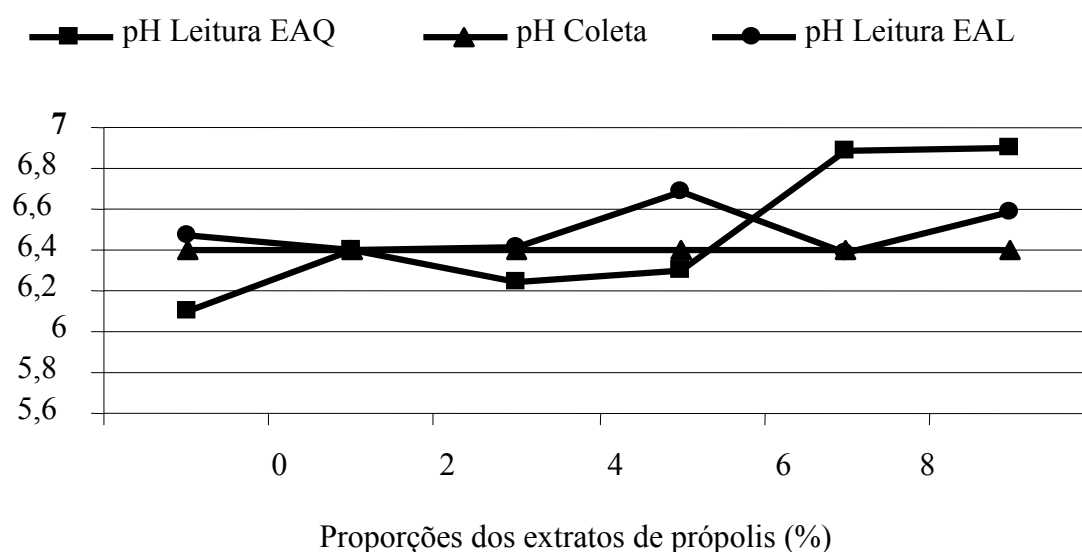


Figura 1 - Comparação entre as variações do pH do líquido ruminal de bovinos sob o efeito de extratos alcoólico (EAL) e aquoso (EAQ) de própolis em diferentes proporções (0%; 2%; 4%; 6%; 8% e 10%).

Coloni et al. (2007) estudando o efeito do extrato de própolis sobre o pH cecal de coelhos obteve que a adição do extrato de própolis não modificou o pH do conteúdo cecal, mostrando que este órgão que é de fundamental importância da digestão dos alimentos fibrosos, não sofreu alteração das doses quanto ao pH, as quais poderiam interferir nos processos fermentativos cecais, e conseqüentemente, no crescimento dos coelhos.

Cunha Filho (2003), estudando extrato alcoólico de própolis nas concentrações 0, 10, 20, e 30%, sob a viabilidade de protozoários ruminais, encontrou que o número de protozoários presentes nos tratamentos teve uma queda acentuada na medida em que se aumentou a concentração de própolis nos extratos testados, apresentando o ponto ótimo na concentração de 10%. Estudando os resultados obtidos em Cunha Filho (2003) e no presente trabalho, fica evidenciado que o extrato aquoso de própolis não deve ser ministrado à bovinos em concentrações acima de 10%, tendo em vista que as concentrações 20 e 30%, elevaram o pH do líquido ruminal acima de 7,0, provavelmente sendo a causa da maior mortalidade, por se conhecer que o bom funcionamento ruminal se dá com o valor de pH em torno de 6,5. Todavia, as concentrações 10% (CUNHA FILHO, 2003) e 0, 2, 4, 6, 8, e 10% (do presente trabalho), não provocaram variações no valor de pH que fossem suficientes para aumentar a mortalidade dos protozoários, tornando-se um resultado positivo, embora preliminar da possibilidade de uso de extratos alcoólicos como alternativa de medicamentos para os bovinos.

O uso da própolis em rações para leitões e para frangos de corte melhorou o ganho de peso diário em 41 e 18% respectivamente, quando comparado aos animais que receberam a dieta sem própolis e ainda apresentando

prevenção às desordens digestivas e proporcionando melhor conversão alimentar (Buhatel et al, 1983).

Com relação ao extrato aquoso, Cunha Filho (2003) encontrou que a concentração 10% mostrou-se significativamente melhor na manutenção dos protozoários viáveis do que as concentrações 20 e 30%, sendo significativamente mais eficiente do que o extrato alcoólico, enquanto que nas concentrações estudadas aqui (0, 2, 4, 6, 8, e 10%), não houve diferença significativa entre os tipos de extratos.

Garcia et al (2004) trabalhando com a adição de própolis em ração para coelhos encontraram que a adição feita em pequenas quantidades (0,1% de extrato seco) na ração demonstrou eficiência sobre o desempenho de coelhos, tendo melhorado o ganho de peso dos mesmos e sua conversão alimentar; e em níveis mais elevados apresentou influência negativa.

Considerando o fato de não terem sido encontradas diferenças significativas entre o extrato aquoso e o extrato alcoólico de própolis nas proporções 0, 2, 4, 6, 8, e 10% e de Cunha Filho (2003) ter encontrado uma melhor atuação do extrato aquoso, entende-se que a maior quantidade de própolis utilizada na preparação dos extratos, (tendo em vista que o tempo de extração das propriedades químicas da própolis foi o mesmo de 30 dias) indica que neste tempo o arraste das propriedades medicinais da própolis foi feito com eficiência, porém em concentrações acima de 10% o teor da substância causadora da inviabilidade dos protozoários é maior do que nas concentrações abaixo de 10%.

Curiosamente trabalhando-se com proporções abaixo de 10%, tanto a água como o álcool, sendo utilizados como substâncias de arraste para as propriedades químicas da própolis, não apresentaram diferenças significativas.

## CONCLUSÃO

Os extratos aquoso e alcoólico de própolis, *in vitro*, nas diferentes concentrações, são passíveis de utilização no líquido ruminal por não alterar a viabilidade dos protozoários, não alterando o pH.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUHATEL, T.; VESA, S.; DIMITRIN, A.; MOLDOVAN, I. Contributii la cunoasterca actiunii biostimulatoare a propolisului asupra tincretului porcilor si aviar. Buletinul Institutului Agronomic, v. 37, n.1, p.45 – 48, 1983.

COLONI, R. D.; LUI, J. F.; SANTOS, E. DOS; NETO, A. C.; ZANATO, J. A. F.; SILVA, L. DA P. G. DA; MALHEIROS, E. B. Extrato etanólico de própolis sobre o ganho de peso, parâmetros de carcaça e pH cecal de coelhos e crescimento. Biotemas, v. 20, n. 2, p. 59 – 64, 2007.

CUNHA FILHO, P. M. Avaliação *in vitro* dos extratos de própolis sobre a viabilidade dos protozoários no líquido ruminal de bovinos: UFPB, 2003. 78p. Dissertação Mestrado.

GARCIA, M., DELLA LIBERA, A. M.M.P.; FILHO, I. R. B. Guia On Line de Clínica Buiátrica. 2002. Disponível em: <<http://www.mgar.vet.br/guiaonline/aspListagem.asp>>. 20 de maio de 2009.

GARCIA, R. C.; SÁ, M. E. P.; LANGONI, H.; FUNARI, S. R. C. Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre o perfil bioquímico e o desempenho de coelhos jovens. Acta Scientiarum – Animal Sciences, v. 26, n. 1, p. 57-67, 2004.

PARK, Y. K., et al., Effect of propolis on *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii* and *Staphylococcus aureus*. Rev. Microbiol., v.29, n.1, p.143-148, 1998.

PINTO, M. S. Efeito antimicrobiano de própolis verde do Estado de Minas Gerais sobre bactérias isoladas do leite de vacas com mastite: UFV, 2000. 92p. Dissertação Mestrado.

S'THIAIGO, L. R. L. 2003. Suplementação de Bovinos em Pastejo: Aspectos práticos para o seu uso na manutenção ou ganho de peso. Disponível em: <<http://www.amireia.com.br/arquivos/trabalhos/cnpqg/suplementthiago.html>>. Acesso em 20 de abril de 2004.

STRADIOTTI- JÚNIOR, D., QUEIROZ, A. C. de, LANA, R. de P., PACHECO, C. G., EIFERT, E. da C., NUNES, P. M. M. Ação da Própolis sobre a Desaminação de Aminoácidos e a Fermentação Ruminal. R. Bras. Zootec., v.33, n.4, p.1086-1092, 2004.

Recebido em 29/01/2010

Aceito em 22/03/2010