

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**EFEITOS DA GEOPRÓPOLIS NA ATIVIDADE MICROBIANA  
RUMINAL**

**Cristiane Simplicio da Silva**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2018**

# **EFEITOS DA GEOPRÓPOLIS NA ATIVIDADE MICROBIANA RUMINAL**

**Cristiane Simplicio da Silva**

Zootecnista

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2015

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção e Manejo de Ruminantes)

**Orientador(a):** Prof(a) Dr(a) Adriana Regina Bagaldo

**Coorientador(a):** Prof(a) Dr(a) Fabiana Lana de Araújo

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586e Silva, Cristiane Simplicio da.  
Efeitos da geoprópolis na atividade microbiana ruminal  
/ Cristiane Simplicio da Silva.\_ Cruz das Almas, BA, 2018.  
43f.; il.

Orientadora: Adriana Regina Bagaldo.  
Coorientadora: Fabiana Lana de Araújo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do  
Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias,  
Ambientais e Biológicas.

1.Ruminante – Nutrição animal. 2.Ruminante –  
Extratos vegetais – Controle. 3.Farmacologia – Análi se.  
I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de  
Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.2085

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmen to das  
Chagas (Bibliotecário - CRB5 / 1615). Os dados para catalo gação foram  
enviados pela usuária via formulário eletrônico.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**EFEITOS DA GEOPRÓPOLIS NA ATIVIDADE MICROBIANA  
RUMINAL**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação  
Cristiane Simplicio da Silva

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018

Prof(a). Dr(a). Adriana Regina Bagaldo  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Orientadora)

Prof(a). Dr(a). Daniele Rebouças Santana Loures  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Examinador interno)

Prof. Dr. Bráulio Rocha Correia  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
(Examinador externo)

## DEDICATÓRIA

Aos meu pais, Maronita e Vicente. Primeiros professores de minha vida, responsáveis por ensinar o amor, justiça, honestidade, solidariedade e perseverança. Vocês me ensinaram a buscar o meu melhor, mesmo em meio às dificuldades.

## AGRADECIMENTOS

Durante a realização de qualquer caminhada sempre contamos com competência, carinho, dedicação e amizade de inúmeras pessoas. Nesta que agora finalizo, quero agradecer a todos, em especial:

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e professores da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, por todas as oportunidades que me proporcionaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora Professora Adriana Regina Bagaldo, por todos os ensinamentos repassados desde a época da graduação até a finalização do mestrado. Profissional que é exemplo de ética, a qual colaborou de forma direta no meu crescimento acadêmico.

À minha coorientadora Professora Fabiana Lana de Araújo, uma pessoa inesquecível, sempre esteve comigo, me ajudando nos momentos difíceis durante esta trajetória, não me deixando desanimar.

Aos técnicos, Núbia, Marcel e Luana que foram muito mais que funcionários, muito obrigada por me ajudarem no meu experimento.

Os amigos de mestrado, Bruna Almeida e Mário Sergio Fernandes, obrigada por permitirem tê-los comigo, me proporcionando momentos inesquecíveis, sendo eles de alegria ou tristeza. Vocês são especiais.

À estagiária Milena Dias, pelos momentos de amizade, paciência e auxílio na execução do experimento.

Agradeço aos meus pais, Maronita e Vicente, pelo apoio financeiro e emocional, uma vez que sempre permaneceram presentes em minha vida.

Ao meu irmão, Cristiano, pelo apoio e amizade.

Ao meu namorado, Luciano Sobral, muitíssimo obrigada por dividir sua vida comigo e aguentar firme minhas chatices por tanto tempo. Serei eternamente grata pela dedicação, amizade e companheirismo.

À família Fraga, em especial à Sandra Maria, Luciano Fraga, Elis Marina e Laísa, pelo acolhimento, carinho e apoio durante esta etapa importante em minha vida.

De maneira especial, à Deus, por colocar pessoas tão especiais em minha vida, permitindo superar todas as dificuldades e atingir meu objetivo.

Muito obrigada a todos!!!

## Efeitos da geoprópolis na atividade microbiana ruminal

**RESUMO:** Objetivou-se estudar o efeito do extrato etanólico de geoprópolis sobre a fermentação ruminal *in vitro* de cinco dietas com diferentes relações volumoso:concentrado. Foram utilizadas quatro concentrações de extrato etanólico de geoprópolis (0, 15, 30 e 60%). As dietas foram compostas por feno de capim Tifton, farelo de soja e milho. A avaliação da fermentação ruminal foi realizada pela técnica de produção de gás *in vitro*. As medições da produção total de gás foram realizadas nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 32, 48, 72 e 96 horas após a incubação *in vitro*. Foi realizada a mensuração de pH e N-NH<sub>3</sub> às 24 horas após a incubação. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (5x4), sendo o primeiro fator relações de volumoso:concentrado (70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70) e o segundo fator, concentração de geoprópolis (0, 15, 30 e 60%). Os parâmetros do modelo de cinética de fermentação ruminal foram estimados pelo método de Gauss-Newton. As estimativas dos parâmetros foram submetidas à análise de variância, regressão e teste de Tukey, sendo considerada significativa à 5% de probabilidade. Para a comparação das médias de pH e N-NH<sub>3</sub> foi utilizado o teste de Tukey, à 5% de probabilidade. Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da inclusão de geoprópolis sobre a cinética de fermentação ruminal *in vitro*. A geoprópolis apresentou efeito ( $P<0,05$ ) sobre pH das dietas, em que provocou um aumento no pH dietas 60:50 e 50:50, sendo este 6,63 e 6,65 respectivamente. As concentrações de N-NH<sub>3</sub> fluido ruminal foram incrementadas ( $P<0,05$ ) com adição da maior concentração de geoprópolis, com exceção da dieta 50:50, que apresentou redução na concentração de N-NH<sub>3</sub> (5,13 mg/dL). As concentrações de extrato etanólico de geoprópolis provocou aumento nos parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*, pH e N-NH<sub>3</sub>, sem que ocorressem efeitos prejudiciais aos processos de fermentação e a microbiota ruminal, quanto a fermentação ruminal *in vitro*, as concentrações de extrato etanólico de geoprópolis utilizadas não se mostram eficientes, o que sugere novos estudos para a determinação de concentrações eficientes.

**Palavras chave:** Fermentação *in vitro*; Degradabilidade; Metano; Nitrogênio amoniacal; pH

## Effects of geopropolis on ruminal microbial activity

**ABSTRACT:** The objective of this study was to study the effect of ethanolic extract of geopropolis on the *in vitro* ruminal fermentation of five diets with different voluminous: concentrate ratios. Four concentrations of ethanolic extract of geopropolis (0, 15, 30 and 60%) were used. The diets were composed of hay of Tifton grass, soybean meal and corn. The evaluation of ruminal fermentation was carried out by the *in vitro* gas production technique. Measurements of total gas production were performed at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, 24, 32, 48, 72 and 96 hours after incubation *in vitro*. The pH and N-NH<sub>3</sub> were measured 24 hours after incubation. The experiment was conducted in a completely randomized design in a factorial scheme (5x4), the first factor being: bulky (70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70) and the second factor, concentration of geopropolis (0, 15, 30 and 60%). The parameters of the ruminal fermentation kinetic model were estimated by the Gauss-Newton method. The parameter estimates were submitted to analysis of variance, Tukey regression and test, being considered significant at 5% probability. For the comparison of pH and N-NH<sub>3</sub> averages, the Tukey's test was used, at 5% probability. There was no effect ( $P > 0.05$ ) of geopropolis inclusion on ruminal fermentation kinetics *in vitro*. The geopropolis presented an effect ( $P < 0.05$ ) on the pH of the diets, in which pH 60:50 and 50:50 diets increased, being 6.63 and 6.65, respectively. The concentrations of N-NH<sub>3</sub> ruminal fluid were increased ( $P < 0.05$ ) with the addition of the highest concentration of geopropolis, except for the 50:50 diet, which showed a reduction in the concentration of N-NH<sub>3</sub> (5.13 mg / dL) . The concentrations of ethanolic extract of geopropolis caused increase in the parameters of ruminal fermentation *in vitro*, pH and N-NH<sub>3</sub>, without harmful effects to the fermentation processes and the ruminal microbiota, as well as the ruminal fermentation *in vitro*, the concentration of ethanolic extract of geopropolis used are not efficient, which suggests new studies for the determination of efficient concentrations.

**Keywords:** *In vitro* fermentation; Degradability; Methane; Ammoniacal nitrogen; pH



## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>1</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>10</b>
1.1	Emissão de metano pelos ruminantes (metanogênese) .....	10
1.2	Modificação do perfil fermentativo ruminal.....	11
1.3	Aditivos ionóforos na nutrição de ruminantes.....	12
1.4	Caracterização da geoprópolis.....	14
1.5	Flavonóides.....	16
1.6	Potencial hidrogeniônico - pH .....	18
1.7	Nitrogênio amoniacal.....	20
1.8	Técnica <i>in vitro</i> .....	22
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
2.1	Local do experimento .....	23
2.2	Análises das características físico-químicas da geoprópolis .....	23
2.3	Extrato etanólico de geoprópolis .....	24
2.4	Dietas .....	24
2.5	Fermentação <i>in vitro</i> .....	26
2.6	Amostragem e medições.....	27
2.7	Análise estatística.....	28
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>38</b>

## INTRODUÇÃO

A criação de bovinos dentro do cenário produtivo do Brasil tem se tornado a atividade pecuária de maior expansão ao longo dos últimos anos, o que tem gerado discursos ambientais em torno da emissão de gases oriunda da fermentação ruminal, devido a relação deste com o efeito estufa. Os principais gases envolvidos no efeito estufa são dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) e o metano (CH<sub>4</sub>).

Os meliponíneos, abelhas nativas, sociais e sem ferrão, ocupam grande parte das regiões de clima tropical no planeta, com grande concentração na América do Sul (SOUZA *et al.*, 2009). Estas abelhas produzem além do mel e própolis, a geoprópolis, que é formada pela mistura de resina vegetal, cera e barro, o qual caracteriza a sua consistência e cor que varia de acordo com o barro da região (BARTH, 2006).

A geoprópolis possui características farmacológicas e químicas que demonstram atividade antibacteriana e antimicótica, atribuídas aos compostos fenólicos.

Devido as suas características antimicrobianas capaz de modificar a fermentação, a geoprópolis tem despertado o interesse dos pesquisadores, podendo agir como um aditivo alimentar natural para as dietas de ruminantes. O própolis e alguns de seus compostos atuam semelhantemente aos ionóforos, por apresentarem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, desta forma provoca a dissipação do potencial de membrana (MIRZOEVA *et al.*, 1997).

Resultados encontrados por várias pesquisas mostram que a ação antibacteriana da própolis ocorre na inibição da atividade antimicrobiana das bactérias gram-positivas (PINTO *et al.*, 2001; FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2006; PACKER e LUZ, 2007; MORSY *et al.*, 2015). Estas por sua vez, são as principais responsáveis pela produção de metano, amônia, dióxido de carbono e acetato no rúmen, promotores de perda de energia do metabolismo ruminal.

A geoprópolis possui em sua composição química fenóis e flavonóides semelhantes aos encontrados na própolis, desta forma acredita-se que a

geoprópolis possa contribuir com a redução das perdas por fermentação além de melhorar a aceitabilidade e comercialização de produtos de origem animal.

Objetivou-se, neste trabalho, avaliar os parâmetros de fermentação ruminal in vitro da geoprópolis como aditivo natural em dietas com diferentes relações volumoso: concentrado.

## 1 REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1 Emissão de metano pelos ruminantes (metanogênese)

No ambiente ruminal, o metano é produzido anaerobicamente por bactérias do gênero *Archaea* metanogênica (*Methanosarcina*, *Methanobrevibacter*, *Methanomicrobium* e *Methanobacterium*) (BEAUCHEMIN *et al.*, 2008). Essas bactérias reduzem dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) para formar metano ( $\text{CH}_4$ ) na presença de hidrogênio ( $\text{H}_2$ ) em excesso no ambiente ruminal (KOZLOSKI, 2011), e geram adenosina trifosfato (ATP) (KUMAR *et al.*, 2009) que são utilizadas como fonte de energia por estes microrganismos.

Em condições laboratoriais, a produção de metano é estimado por simulação das fermentações ruminais em frascos de vidro incubados com microrganismos presente no ambiente ruminal, sendo que o gás formado no interior dos frascos pode ser medido em intervalos previamente determinados (MAURICIO *et al.*, 1998)

Segundo McCallister e Newbold (2008) altas concentrações de  $\text{H}_2$  no rúmen, provocam a inibição dos sistemas enzimáticos, principalmente os processos relacionados com a nicotinamida adenosina difosfato ( $\text{NADH} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+$ ). Os ruminantes realizam a eructação e flatulência como formas de dissipar para o ambiente as moléculas de  $\text{H}_2$  produzidas em excesso, por meio da produção de metano, garantindo o bom funcionamento do rúmen (COTTLE *et al.*, 2011; BERCHIELLI, *et al.*, 2012).

A produção de metano resultante da fermentação ruminal reflete em perdas relevantes de energia da dieta para o animal, sendo que esta perda de energia pode refletir em 6% a 10% da energia bruta da dieta que é perdida ao longo do processo fermentativo (ECKARD *et al.*, 2010).

Nas últimas décadas, pesquisas na área de microbiologia ruminal vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de se redirecionar a energia perdida durante a produção de metano para a produção de carne e leite, determinando melhor a utilização dos nutrientes (NAGAJARA, 2003).

O tipo de fermentação resultante do alimento pode variar de alta emissão de metano, caracterizado por alta proporção acetato:propionato, a uma baixa emissão de metano caracterizado por uma baixa proporção acetato:propionato (JOHNSON E JOHNSON, 1995).

A metanogênese pode ser reduzida das seguintes formas: inibição de reações que liberam hidrogênio no rúmen, estimular reações alternativas que recebem o hidrogênio durante a reoxidação de equivalentes redutores e determinar reações alternativas consumidoras de hidrogênio. (HEGARTY, 1999).

Pedreira *et al.* (2005) relataram que a quantidade do alimento ingerido bem como a qualidade da dieta estão diretamente associadas com a capacidade de produção de metano, onde normalmente as dietas com elevada digestibilidade favorecem maior consumo e menor produção de metano, o oposto ocorre com dietas de baixa qualidade.

Nussio *et al.* (2011) destacam que a quantidade de hidrogênio disponível para a formação de metano pode ser reduzida com o aumento na taxa de fermentação, aumento na taxa de passagem da digesta, decréscimo da ruminação ou pH. Além da qualidade da dieta, fatores intrínsecos aos animais, como características genéticas e a microflora ruminal influenciam na emissão de metano entérico (HAMMOND *et al.*, 2008).

Na tentativa de reduzir as perdas de energia e também minimizar a mitigação de metano e dióxido de carbono para o ambiente, tem-se empregado cada vez mais a modificação do perfil fermentativo ruminal.

## **1.2 Modificação do perfil fermentativo ruminal**

A manipulação ruminal, pela utilização de aditivos introduzidos na alimentação de ruminantes, tem proporcionado alternativas para aumentar a eficiência de utilização das dietas e também promover a redução da produção de metano, amenizar os impactos dos sistemas de produção no ambiente (MORAIS *et al.*, 2011).

É necessário a modificação da microbiota ruminal para melhorar a relação simbiótica entre os microrganismos ruminais e hospedeiro favorecer os processos fermentativos. A manipulação da fermentação ruminal deve fornecer ácidos graxos voláteis (acetato, propionato e butirato) (PRADO *et al.*, 2010) os quais constituem de 60 a 80 % da energia metabolizável utilizada pelos ruminantes (FURLAN *et al.*, 2011).

Os principais efeitos esperados da manipulação da fermentação ruminal são: melhorar os processos benéficos, minimizar, deletar ou alterar os processos ineficientes, minimizar, deletar ou alterar os processos prejudiciais para o animal hospedeiro (BERCHIELLI *et al.*, 2012). Dentre os processos benéficos obtidos pela manipulação da fermentação ruminal incluem degradação da fração fibrosa, conversão de compostos nitrogenados não-protéicos em proteína microbiana, fermentação do lactato; e entre os processos que deveriam ser minimizados estão a produção de CH<sub>4</sub>, degradação da proteína e absorção de amônia (NAGARAJA *et al.*, 1997).

Com a manipulação da fermentação ruminal também é possível atenuar doenças ligadas aos distúrbios metabólicos tais como a acidose láctica e o timpanismo. Sendo que a acidose láctica está relacionada com o aumento das taxas de lactato produzido durante a fermentação ruminal por bactérias como: *Streptococcus bovis*, *Lactobacillos*, *Butyrivibrio* e *Lachnospira*; já o timpanismo está associado a altas concentrações de gases oriundos da fermentação ruminal, principalmente o CO<sub>2</sub> (MORAIS *et al.*, 2011).

### 1.3 Aditivos ionóforos na nutrição de ruminantes

Os ionóforos são produtos oriundos da fermentação de várias espécies de *Streptomyces*, existem mais de 120 tipos de antibióticos ionóforos, em que apenas a monensina, lasalocida, salinomina e a laidomicina propionato são liberadas para uso na alimentação ruminantes (MORAIS *et al.*, 2011), entre os ionóforos, a monensina sódica é o mais utilizado na nutrição de ruminantes.

Os ionóforos são geralmente bacteriostáticos e não bactericidas (NAGAJARA E TAYLOR, 1987) que modificam o fluxo de cátions através da membrana por meio do mecanismo chamado de bomba iônica. Possuem maior eficiência de atuação em bactérias gram-positivas, enquanto que nas bactérias gram-negativas apresentam pouca ou nenhuma atividade, isso se deve ao fato dessas bactérias apresentarem uma membrana externa formada por proteínas, lipoproteínas e liposacarídeos com tamanho de 600 Daltons (RUSSELL E STROBEL, 1989), o que limita a entrada dos ionóforos, pois a maioria deles são maiores que 600 Daltons (NAGARAJA *et al.*, 1997), esta característica torna as bactéria gram-negativas mais resistentes ao mecanismo de ação destes antimicrobianos (RUSSELL E MANTOVANI, 2002).

A utilização de ionóforos é considerado de risco crescente, devido a possibilidade de intoxicação dos animais, pelo uso inadequado desses produtos, e possível resistência das bactérias (RÍSPOLI *et al.*, 2009). Esta resistência à ação dos ionóforos, está intimamente relacionada com a adaptação da microbiota ruminal após certo período de exposição, retornando a sua capacidade de produção de metano (GUAN *et al.*, 2006). A Organização Mundial da Saúde também considera o uso de antibióticos na produção animal um fator de risco para a saúde humana (MORAIS *et al.*, 2011). Em virtude destes fatos, desde 2009, órgãos oficiais da União Europeia têm apresentado restrições e proibições quanto ao uso de ionóforos, com a intenção de assegurar a saúde humana.

A atuação da própolis e alguns de seus compostos se assemelham aos ionóforos, por apresentarem efeitos sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática bacteriana aos íons, ocasionando a dissipação do potencial de membrana, ocasionando prejuízos a síntese de ATP, bem como a motilidade das bactérias gram-positivas e o transporte de íons (MIRZOEVA *et al.*, 1997). Essa atividade pode estar relacionada à ação sinérgica de compostos fenólicos com outros compostos químicos são os responsáveis pela ação antimicrobiana da própolis e da geoprópolis (BANKOVA, 2005).

A geoprópolis possui atividade antimicrobiana semelhante aos extratos etanólicos de própolis da abelha *Apis mellífera* (FERNANDES JUNIOR *et al.*, 2001). Resultados encontrados em pesquisas mostram que a ação

antibacteriana da geoprópolis ocorre na inibição da atividade antimicrobiana das bactérias gram-positivas e limitada para as bactérias gram-positivas (VELIKOVA *et al.*, 2000; DUALIBE *et al.*, 2007; LIBÉRIO *et al.*, 2011). Estas por sua vez, são as principais responsáveis pela produção de metano, amônia, dióxido de carbono e acetato no rúmen, promotores de perda de energia do metabolismo ruminal.

Deste modo pesquisas têm buscado produtos alternativos para substituir esses aditivos na produção animal, que tenham ação semelhante, mas sem causar riscos à saúde do consumidor, entre eles a geoprópolis por apresentar várias características de interesse.

#### 1.4 Caracterização da geoprópolis

As abelhas sociais pertencem ao reino Animalia; Filo Arthropoda; Classe *Insecta*; Ordem *Hymenoptera*; Superfamília *Apoidea*; Família *Apidae*, Subfamília *Meliponinae*; Tribo *Meliponini* (VILLAS-BÔAS, 2012) conhecidas comumente como abelhas sem ferrão, abelhas nativas, abelhas indígenas, ou simplesmente “meliponíneos” ou “melíponas”, são assim conhecidas devido a presença de um ferrão atrofiado.

As abelhas sociais apresentam grande diversidade, de acordo com Carvalho *et al.* (2005) existem cerca de 300 espécies, que se destacam como responsáveis por 90% da polinização de diversas culturas agrícolas (DUARTE *et al.*, 2008), possuem ampla distribuição geográfica, são muito comuns em vários países tropicais e subtropicais (SOUZA *et al.*, 2009).

O termo geoprópolis foi proposto inicialmente pelo Professor Paulo Nogueira (NOGEIRA-NETO, 1997), que acrescentou o prefixo “geo” a palavra própolis, devido a presença de barro na própolis, incorporado pelas abelhas sem ferrão.

A geoprópolis é produzida pelas abelhas sociais ou sem ferrão, composto por uma mistura de resina vegetal, cera, secreções mandibulares e barro (BARTH, 2006). Dentro das colônias, a geoprópolis possui diversas funções,



como construção de estruturas externa (tubos de entrada) e interna (discos de cria, lamelas de invólucro e potes de alimento) (SANTOS *et al.*, 2009), é utilizada também para a mumificação de insetos inimigos ou competidores de espaço (ALVES *et al.*, 2007).

A geoprópolis apresenta uma textura maleável e quebradiça em virtude da quantidade do conteúdo mineral e da qualidade da resina utilizada pelas abelhas (BARTH e FREITAS, 2015).

Apresenta coloração variada, conforme as fontes de resina e cor do solo coletado pelas abelhas, no entanto a geoprópolis possui geralmente coloração marrom escura e sabor amargo (CUNHA *et al.*, 2009; AGUERO *et al.*, 2010).

A composição química da geoprópolis é pouco conhecida. Tomas-Barberan *et al.* (1993) avaliaram compostos fenólicos de geoprópolis de cinco espécies de abelhas da Venezuela, na qual houve maior predominância do composto do tipo benzofenonas preniladas.

Duarte *et al.* (2008) encontraram substâncias das classes dos compostos fenólicos, dos triterpenos e das saponinas presentes na composição química de extratos hidroalcoólicos da geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada Maranhense.

Cardozo *et al.* (2015) identificaram por espectrometria de massas e análise dos componentes principais, as presenças de 12 compostos (valina, ácido *p*-cumárico, 3-hidróxi-4metóxi-cinamaldeído, ácido caféico, canferol, canferida, di-hidrocanderida, ácido E/Z comunico, ácido agatálico, ácido cupréssico, ácido isocupréssico e ácido 15-acetoxi-isocupréssico) na composição da geoprópolis coletada na região do Paraná.

Bankova *et al.* (1998) identificaram mais de cinquenta compostos das classes dos ácidos graxos, ácidos aromáticos, flavonóides, diterpenos e triterpenos, na composição química de geoprópolis avaliada em três diferentes de abelhas (*Melipona compressipe*, *Melipona quadrifasciata anthidiolides* e *Teragona clavipes*) encontradas no território brasileiro. As principais classes de compostos identificados foram os ácidos graxos (ácidos esteárico, palmítico e mirístico), diterpenos (ácido dehidroabiético, kaur-16-eno) e triterpenos ( $\beta$ -amirina e isômeros, nor-oleano-12-eno e friedooleanan-3-ona). Neste estudo foi sugerido que composição química da geoprópolis, está relacionada com as

características ecológicas da flora visitada e da espécie de abelhas (Bankova *et al.*, 1998).

Portanto, fica evidente a necessidade de mais pesquisas com a geoprópolis, para que haja maior entendimento de suas atividades biológicas, principalmente devido à grande diversidade em sua composição.

## 1.5 Flavonóides

Os flavonóides são uma grande classe dos compostos polifenólicos presente nas plantas, os quais desempenham várias funções dentre elas pode-se citar: a defesa contra microrganismo e insetos, atração e orientação dos insetos até o néctar (FONTANA *et al.*, 2004). Os flavonóides são formados por 15 átomos de carbonos, arranjados em anéis aromáticos em configuração C6-C3-C6, em que os dois anéis C6 são impreterivelmente aromáticos e conectados por uma ponte de três carbonos que normalmente contém um átomo de oxigênio (LOPEZ *et al.*, 2000).

Conforme suas características químicas, os flavonóides podem ser divididos em várias classes: flavonas, flavonóis, dihidroflavonóides (flavanonas e flavanonóis), antocianidinas, isoflavonóides, auronas, neoflavonóides, biflavonóides, catequinas e seus precursores metabólicos conhecidos como chalconas e podem ocorrer como agliconas, glicosilados e como derivados metilados (HAVSTEEN, 2002).

Os flavonóides também estão presentes na composição química da geoprópolis com maior predominância entre os compostos (DUARTE *et al.*, 2008). A atividade antibacteriana da geoprópolis está relacionada à presença de flavonóides em sua composição química, em que uma maior presença deste composto, reflete em uma maior atividade antibacteriana (SOUZA *et al.*, 2015).

A atividade antibacteriana da geoprópolis foi observada por Souza *et al.* (2015) como o uso de extrato hidroalcoólico de geoprópolis sobre populações de bactérias gram-negativas *E. aerogenes* e *E. coli* e a bactéria gram-positiva *S. aureus*.

Kim *et al.* (2015) avaliaram os efeitos de extrato vegetais ricos em flavonóides sobre a metanogênese ruminal *in vitro*, observaram que a produção total de gás na presença dos extratos foram superiores aos do controle após 24 horas de incubação, entretanto observaram diminuição da produção de metano quando comparado ao controle, sendo esta de 47,6; 39,6; 46,7 e 48,8% nos tratamentos com extrato de *Punica granatum*, *Betula schmidtii*, *Ginkgo biloba* e *Cudrania tricuspidata* respectivamente. Também foi verificada diminuição de todas as populações de *Ruminococcus albus* e *Ruminococcus flavefaciens* para todos os extratos. A diminuição da produção de metano ocorrida nesse estudo, não provocou danos às características de fermentação ruminal *in vitro* após 24 horas de incubação.

Oskoueian *et al.* (2013) avaliaram os efeitos da atividade dos flavonóides na fermentação ruminal, produção de metano e população, neste estudo foi observado redução da produção de metano e da população de protozoários metanogênicos, sem que houvessem efeitos negativos dos flavonóides sobre a degradabilidade da matéria seca e outros parâmetros da fermentação ruminal.

A produção de leite de vacas pode ser aumentada com a suplementação de flavonóides devido a uma melhor fermentação ruminal, além disso, os flavonóides são capazes de proteger o ambiente ruminal da acidose, este efeito pode ser explicado pelo aumento do número de microrganismos que consomem lactato no rúmen (BALCELLS *et al.*, 2012).

Freitas *et al.* (2009) estudaram os efeitos da adição do extrato de própolis na alimentação de vacas da raça Holandesa, observaram aumento na produção de leite dos animais que receberam o extrato de própolis (64mL) quando comparado ao grupo controle, este aumento foi de 25,62 e 22,62 kg/dia respectivamente, ainda segundo estes autores o aumento da produção de leite está relacionada ao processo de desaminação de aminoácidos promovido pela presença do extrato de própolis, em que este processo ocasionou economia de energia para o animal. O mesmo foi verificado por Stradiotti Júnior *et al.* (2004a) ao trabalharem com extrato de etanólico de própolis a 30%, verificaram sua eficiência sobre a redução na desaminação ruminal de bovinos.

## 1.6 Potencial hidrogeniônico - pH

O pH ruminal pode alterar os processos digestivos bem como a função microbiana e os produtos finais da fermentação. Portanto, o pH é fator determinante para a sobrevivência dos microrganismos presentes no rúmen e sua redução possui relação com efeitos associativos negativos (GOES *et al.*, 2010). Segundo Silveira *et al.* (2006) o pH ruminal varia de acordo com a dieta e o tempo após a ingestão de alimentos.

De acordo com Franzolin e Dehority (2010) pH inferior a 5,5 é nocivo para a sobrevivência dos protozoários ciliados e pode promover o crescimento de bactérias produtoras de lactato, desencadeantes da acidose ruminal. Segundo Van Soest (1994), em condições de pH abaixo de 6,2 ocorre aumento do tempo de colonização da fibra e, conseqüentemente, inibe a sua degradação. Desta forma, as bactérias fibrolíticas e protozoárias precisam de um faixa de pH variando entre 6,2 e 6,8 para agirem adequadamente. O retardamento a adesão dos microrganismos à celulose ocorre em virtude da deficiência de compostos que são responsáveis pelo aumento a adesão, tais como o bicarbonato, ou o aumento de compostos que atuam na inibição a adesão como o amido solúvel (FOTITUS *et al.*, 2014).

O pH ideal encontra-se entre 5,5 e 7,0, e o mesmo é influenciado pelo tipo de alimento ingerido, ou seja, em níveis de suplementação altos o pH diminui (FURLAN *et al.*, 2011).

Em estudo avaliando os efeitos do extrato etanólico de própolis a 30% e da monensina sódica sobre a ingestão de matéria seca, digestibilidade de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal e hematológicos de ovinos, Silva *et al.* (2015) observaram valor mínimo de pH entre 5,4 e 5,6 nos animais que receberam extrato etanólico de própolis na alimentação sem que houvesse danos à digestão das fibras.

Costa Júnior *et al.* (2012) avaliaram o efeito de produtos de própolis (própolis em pó - LLOS) sobre o consumo da matéria seca, a digestibilidade dos nutrientes totais, as características ruminais e a eficiência microbiana em bubalinos alimentados com uma dieta baseada em volumoso, com quatro

concentrações: controle ( sem LLOS); LLOS C1 (0,092 mg/g de flavonoides crisina); LLOS C1+ (0,184 mg/g de flavonoides crisina); LLOS B3+ (0,272 mg/g de flavonoides crisina), observaram menor valor de pH (6,65) em novilhos alimentados com dietas com LLOS C1.

Prado *et al.* (2010b) avaliaram os efeitos da utilização de produtos contendo própolis (própolis em pó), em duas concentrações (LLOSC1; 57,3% e LLOSB3; 49,09%) e de monensina sódica em dieta à base de forragem sobre o consumo, a digestibilidade total e parcial e as características ruminais em bovinos e observaram que a inclusão de própolis refletiu em menor pH ruminal, em comparado com ao controle e a monensina sendo este de: 6,24 (LLOSC1); 6,18 (LLOSB3); 6,37 (controle) e 6,43 (monensina).

Entretanto, em estudo realizado por Peixoto *et al.* (2010), não foi verificada alterações no pH em diferentes concentrações (0, 2, 4, 6, 8 e 10 %) dos extratos aquoso e alcoólico de própolis no líquido ruminal de bovinos. A maior variação encontra para o extrato aquoso de própolis nas concentrações de 8 e 10%, em que houve aumento do pH da coleta (6,4) para 6,88 (8%) e 6,90 (10%), para o extrato alcoólico foi evidenciado a maior alteração para o nível de 6%, que apresentou um pH de leitura de 6,69.

Ozturk *et al.* (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de extrato etanólico de própolis na fermentação ruminal *in vitro*, observaram que as duas concentrações de extrato de própolis utilizadas (20 e 60%) não alteraram o pH ruminal ao serem comparadas com o controle. Os valores encontrados foram: 6,81 (20% de extrato etanólico de própolis; 0,5 mL/dia); 6,80 (60% de extrato etanólico de própolis; 0,5 mL/dia) e 6,80 (solução de álcool à 70% sem própolis; 0,5 mL/dia).

Morsy *et al.* (2015) realizaram estudo para comparar os efeitos dos extratos etanólicos da própolis vermelha brasileira e da própolis marrom egípcia na degradação ruminal de nutrientes e metanogênese *in vitro*, os extratos de própolis foram incubados nas concentrações de: 0 (controle negativo); 125; 250 e 500 mg. Observaram que o pH médio foi mantido em 6,70, sem diferença significativa entre os tratamentos, acredita-se que a diferença entre os estudos esteja relacionada principalmente a dose utilizada, uma vez que a dose do EEG foi superior, sendo a possível causa para a variação pH.

Segundo Homem Júnior *et al.* (2010), a presença de concentrado na dieta e maior produção de ácidos graxos voláteis resultantes da fermentação dos carboidratos não fibrosos, potencializam a queda do pH ruminal.

A disponibilidade de substrato para os processos fermentativos associado com o pH são fatores primordiais para o desenvolvimento dos microrganismos no ambiente ruminal (Ørskov E Tyle, 1990).

### 1.7 Nitrogênio amoniacal

A concentração de nitrogênio amoniacal no fluido ruminal é determinada pela taxa de degradação da fonte proteica utilizada e do equilíbrio entre sua produção e utilização por parte dos microrganismos ruminais (MANELLA *et al.*, 2003). Segundo Santos e Mendonça (2011) a energia disponível no rúmen, entre outros fatores, é responsável pela eficiente utilização amônia pelos microrganismos para a síntese microbiana.

Os ruminantes absorvem N-NH<sub>3</sub> ao passo que sua concentração no ambiente ruminal aumenta, sendo considerado tóxico quando este atinge valores de concentração superiores de 100 mg/100 mL (FRANCO *et al.*, 2002).

Detmann *et al.* (2007) realizaram um levantamento sobre a concentração de N-NH<sub>3</sub> e determinaram como concentração mínima de 10mg/dL para melhor adequação do meio de crescimento à disponibilidade de compostos nitrogenados para o anabolismo microbiano.

A produção de amônia excedente é eliminada do ambiente ruminal por meio da difusão pela parede ruminal sendo transportada para o fígado; onde é convertida em uréia. Desta forma uma parte dessa uréia retorna para o rúmen via saliva ou corrente sanguínea, o restante entra na corrente sanguínea e é excretada na urina (VAN SOEST, 1994).

Alguns trabalhos recentes, *in vitro* e *in vivo*, demonstram o efeito inibitório de extrato de própolis sobre os microrganismos ruminais, reduz a desaminação de aminoácidos.

Com o objetivo de avaliar os efeitos *in vitro* dos inibidores monensina e própolis sobre a fermentação ruminal de aminoácidos, Oliveira *et al.* (2006) verificaram que a adição da própolis diminuiu o N-NH<sub>3</sub> no fluido ruminal, sendo este valor de 5,54 mg/ 100mL de nitrogênio amoniacal.

Prado *et al.* (2010) avaliaram a inclusão de produtos LLOS B3 e LLOS C1, em duas concentrações de própolis (B e C, em que B foi menos concentrado que C) e duas extrações alcoólicas (1 e 3, em que 1 foi menos concentrado que 3) e a monensina sódica em dieta à base de forragem para bovinos e constataram que, LLOSB3 (11,2%) e LLOSC1 (16,3%) destacaram-se por reduzir as perdas ruminais de N-NH<sub>3</sub>, que foram maiores para a dieta com monensina (27,2%), seguido da dieta controle (24,0%).

Com o objetivo de avaliar os efeitos do extrato etanólico de própolis a 30% e monensina sódica sobre a ingestão de matéria seca, digestibilidade de nutrientes e parâmetros de fermentação ruminal e hematológico de ovinos, Silva *et al.* (2015), observaram que os níveis médios de N-NH<sub>3</sub> (7,3 mg dL<sup>-1</sup>) não foram afetados pelos diferentes tratamentos.

Ozturk *et al.* (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações (20 e 60%) de extrato de própolis sobre a fermentação microbiana ruminal *in vitro*, verificaram efeito positivo na redução de N-NH<sub>3</sub> para as concentrações de extrato de própolis usadas ao serem comparadas com o controle. Os valores de N-NH<sub>3</sub> observados foram de 9,51 mmol/l (solução de álcool à 70% sem própolis; 0,5 mL/dia); 7,25 mmol/l (20% de extrato etanólico de própolis; 0,5 mL/dia) e 5,78 mmol/l (60% de extrato etanólico de própolis; 0,5 mL/dia). De acordo com o autor, a diminuição do N-NH<sub>3</sub> nas concentrações de extrato de própolis utilizadas, pode ser associada à redução da desaminação de aminoácidos ou à taxa de crescimento reduzida de bactérias fermentadoras de aminoácidos na presença de extrato de própolis; uma vez que a concentração de N-NH<sub>3</sub> é determinada pelo balanço entre a desaminação de aminoácidos e a utilização de N-NH<sub>3</sub> por microrganismos ruminais (Öztürk, 2009).

A amônia presente no rúmen é influenciada diretamente pela relação proteína degradada no rúmen (PDR) e proteína não degradada no rúmen (PNDR) contida nos ingredientes da dieta, bem como os teores de nitrogênio não protéico

(NNP) e nitrogênio amoniacal, sendo este último presente em alimentos volumosos conservados na forma de silagem.

### 1.8 Técnica *in vitro*

Os experimentos *in vivo* são muito onerosos, por necessitarem de um grande número de animais e um maior tempo para sua execução. Mediante a estes atributos, experimentos em *in vitro* tem se mostrado uma solução de baixo custo barata e rapidez na obtenção dos resultados, que possibilita avaliar um grande número de amostras com baixas quantidades de substrato (MAKKAR, 2005).

Devido à capacidade de caracterizar a cinética da fermentação ruminal, determinar a produção de nitrogênio amoniacal, metano e ácidos graxos de cadeia curta, além de permitir estimar a degradação ruminal e apresentar a possibilidade de verificar os efeitos dos antinutricionais contidos nos alimentos com precisão, a técnica *in vitro* de produção de gás é bastante utilizada pelos pesquisadores em nutrição animal (SALLAM *et al.*, 2009).

Dentre as técnicas *in vitro* de produção de gases utilizadas na nutrição animal destaca-se a técnica de produção desenvolvida por Theodorou *et al.*(1994) e a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases elaborada por Maurício *et al.*(1999).

A metodologia desenvolvida por Theodorou *et al.* (1994) baseia-se na leitura do volume de gás produzido por meio de seringas graduadas. Apesar de ter como vantagem precisão os parâmetros da fermentação ruminal, apresenta como desvantagens: a necessidade de mais tempo para a realização das leituras, e a leitura manual do volume de gás comprometendo a acurácias dos dados (MAURÍCIO *et al.*, 1999).

Mauricio *et al.* (1999) realizaram adaptações na metodologia desenvolvida por Theodouro *et al.* (1994), com a substituição da seringa usada para realizar a leitura de volume de gás por sensores com leitura direta do gás, facilitando a mensuração do gás produzido, além do aumento do número de coletas de gás, permitindo maior acurácia nos dados obtidos.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (nº 23007.025687/2016-05).

### 2.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido no laboratório de bromatologia da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia *Campus* Cruz das Almas-BA.

### 2.2 Análises das características físico-químicas da geoprópolis

As amostras de geoprópolis utilizadas foram produzidas pelas abelhas *Tetragonisca angustula* (Jataí) em apiários localizados na Baía do Iguape, pertencente à Baía de Todos os Santos situada cerca de 100km a leste de Salvador.

As amostras foram coletadas mensalmente, totalizando 12 coletas realizadas no ano de 2015. Foi feita uma composta de todas as coletas, as amostras foram encaminhadas ao núcleo de estudo dos Insetos (INSECTA) onde posteriormente foram submetidas a uma análise de determinação de compostos fenólicos do extrato etanólico, também foi realizada análise química da geoprópolis para os teores de unidade, matéria mineral, cera, proteína bruta (tabela 1), segundo metodologia descrita por Funari e Ferro (2006), também foram realizadas análise para quantificação de fenóis e flavonóides totais na amostra (SINGLETON *et al.*, 1999) e análise para determinação de flavonóides totais (PARK *et al.*, 2007).

**Tabela 1:** Composição da geoprópolis.

Item	
Perda por dessecação	54,4 (g/kg MS)
Cinzas	296,1 (g/kg MS)
Proteína bruta	31,6 (g/kg MS)
Cera	43,2 (g/kg MS)
Fenóis totais	300 (mg/mL GS)
Flavonóides totais	70(mg/mL GS)

MS= matéria seca; GS= geoprópolis seca

### 2.3 Extrato etanólico de geoprópolis

Para obtenção do extrato da geoprópolis, foram utilizados 30 g de geoprópolis bruta triturada em moinho de bola, adicionada à 100 mL de solução etanólica (70 v/v) de álcool de cereais, armazenado ao abrigo de luz por um período de 10 dias para extração, agitada diariamente. Após este período, foi realizada a filtragem em papel-filtro, obtendo-se a solução estoque de extrato de geoprópolis (STRADIOTTI JUNIOR *et al.*, 2004b).

Após a obtenção da solução estoque, foram confeccionados extratos etanólicos de geoprópolis nas concentrações de 15% (4,5g de geoprópolis); 30% (9g de geoprópolis) e 60% (18g de geoprópolis) diluídas em álcool de cereais.

### 2.4 Dietas

Foram formuladas 5 dietas com 70:30; 60:40; 50:50; 40:60; 30:70 relação volumosos: concentrado. O volumoso utilizado foi feno de capim Tifton 85 e o concentrado foi composto por farelo de milho e soja. As dietas experimentais foram formuladas simulando as exigências de um bovino jovem em fase de recria com peso corporal médio de 350 kg e ganho médio diário de 0,80 kg/dia segundo Valadares Filho *et al.* (2017).

Os ingredientes (tabela 2) e dietas (tabela3) foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato

etéreo (EE) conforme AOAC (2000), pelos métodos 930.15, 932.05, 976.05 e 920.39, respectivamente; e na tabela 4 estão contidos os percentuais dos ingredientes das dietas. Os teores de fibra em detergente neutro (FDN), lignina e fibra em detergente ácido (FDA) foram determinados segundo as descrições de Van Soest *et al.* (1991). Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados segundo Hall (2000).

$$\text{CNF} = 100 - (\text{PB} + \text{EE} + \text{MM} + \text{FDN})$$

Em que:

CNF = teor estimado de carboidratos não fibrosos (%);

PB = teor de proteína bruta (%);

EE = teor de extrato etéreo (%);

MM = teor de matéria mineral (%);

FDN = teor de fibra em detergente neutro (%)

**Tabela 2:** Composição química bromatológica dos ingredientes das dietas experimentais.

Item (g/kg MS)	Ingredientes		
	Farelo de soja	Milho moído	Feno de Tifton 85
MS	875,1	879,3	906,7
MM	64,2	14,2	65,5
PB	397,1	90,4	98,1
EE	18,7	63,5	16
FDN	202,6	132,1	726,1
FDA	117,7	42,3	420,6
LIG	15,5	13,2	62,5
CNF	317,4	699,8	94,3

MS- matéria seca; MM- matéria mineral; PB- proteína bruta; EE- extrato etéreo; FDN- fibra em detergente neutro; FDA- fibra em detergente ácido; LIG- lignina; CNF- carboidratos não fibrosos.

**Tabela 3:** Composição química bromatológica das dietas (g/kgMS)

Item (g/kg MS)	Dietas				
	70:30	60:40	50:50	40:60	30:70
MS	905,8	901	898,6	896,1	799,7
MM	31	31,6	31,9	32,2	32,2
PB	90,5	94,1	95,9	97,7	97,7
EE	69,5	72	73,3	74,6	74,6
FDN	123	128,3	130,9	133,6	133,6
FDA	52,9	54,6	55,5	56,3	56,3
LIG	30,2	30,7	31	31,2	31,2
CNF	565,8	593,8	607,8	621,8	621,8

MS- matéria seca; MM- matéria mineral; PB- proteína bruta; EE- extrato etéreo; FDN- fibra em detergente neutro; FDA- detergente neutro; FDA- fibra em detergente ácido; LIG- lignina; CNF- carboidratos não fibrosos.

**Tabela 4:** Composição percentual dos ingredientes, com base na matéria seca

Ingrediente	Dietas				
	70:30	60:40	50:50	40:60	30:70
Farelo de soja	7,5	10	12,5	15	17,5
Milho moído	22,5	30	37,5	45	52,5
Feno de Tifton 85	70	60	50	40	30

## 2.5 Fermentação *in vitro*

A cinética de fermentação ruminal foi estimada por meio da técnica semiautomática com transdutor de pressão desenvolvida por Throdorou *et al.* (1994) juntamente com a técnica descrita por Maurício *et al.* (1999). Em que frascos de vidro são adicionados líquido ruminal acrescido de um meio de incubação e o substrato, em seguida os frascos são selados e incubados em estufa à 39°C, ocasionado o acúmulo de gás no espaço vazio dentro do frasco. Um transdutor de pressão foi usado para aferir a pressão interna formada no interior do frasco.

O líquido ruminal foi obtido de dois bovinos de raça nelore, canulados no rúmen, os dois animais foram submetidos à uma dieta a base de forragem verde. A coleta do líquido ruminal foi realizada com os animais em jejum.

O líquido coletado dos dois animais doadores foi armazenado em recipientes térmicos pré-aquecidos (39°C) sob condições anaeróbias separadamente e imediatamente transportado para o laboratório, onde foram feitas misturas em igual volume do líquido coletado dos animais doadores, por 10 segundos, este procedimento foi realizado devido à grande quantidade de inóculo necessário e assegurar que as variações naturais entre os animais fossem mantidas. Em seguida o inóculo foi filtrado em camada tripla de gazes e mantidos em banho-maria com temperatura de 39°C até o início da incubação (THRODOROU *et al.*, 1994).

Foi preparado previamente à coleta do inóculo, uma solução tampão de McDougall (1948) constituída por: 9,80 g/L de NaHCO<sub>3</sub>; 7,0 g/L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 0,57 g/L KCl; 0,47 g/L de NaCl; 0,12 g/L de MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O; 0,05

g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  completados até um volume de 1000 mL com água destilada e o pH ajustado para 6,8 por meio de borbulhamento de  $\text{CO}_2$ .

Para a fermentação *in vitro*, 400mg de cada dieta foram colocadas em frascos com capacidade para 100 mL, juntamente com os tratamentos da geoprópolis, foram adicionados 30 mL da solução composta por 8 mL de inóculo ruminal e 22 mL de solução tampão (McDOUGALL, 1948), o mesmo procedimento foi realizado para o tratamento controle. Para os tratamentos com geoprópolis foram adicionados 0,2mL de extrato etanólico de geoprópolis (EEG).

Os frascos foram selados imediatamente com rolhas de borracha e lacre metálico, para evitar a perda de gases, imediatamente após a incubação, a pressão dos frascos foi estabilizada através de agulhas (25 mm x 7 mm) nas tampas dos frascos, posteriormente as agulhas foram removidas (MARQUES *et al.*, 2013).

Os frascos foram homogeneizados manualmente e colocados em estufa de circulação forçada durante todo o período de análise dos dados, em temperatura constante de 39°C.

## 2.6 Amostragem e medições

As leituras de pressão foram tomadas em maior frequência durante o período inicial de fermentação e reduzidas posteriormente: 0, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 24, 30, 32, 48, 72 e 96 h, a pressão (psi = pressão por polegada quadrada) originada dos gases acumulados na parte superior dos frascos foi obtida utilizando-se transdutor de pressão (modelo MPX50100DP), acoplado à uma agulha (0,7mm) para perfurar as rolhas de borracha sintéticas encaixadas nos frascos (MARQUES *et al.*, 2013).

A equação de regressão utilizada para conversão de pressão (P) para volume [V (mL) =  $3.6015 \cdot P - 0.0125 \cdot P^2 - 0.1118$  ( $R^2 = 0,99$ )], padronizada segundo metodologia proposta por Maurício *et al.* (2003).

Os valores estimados para os parâmetros da cinética de fermentação ruminal dos tratamentos foram obtidos segundo modelo logístico bicompartimental proposto por Schofield *et al.* (1994):

$$V(t) = \frac{Vf}{1 + e^{[2-4k(t-\lambda)]}} + \frac{Vf2}{1 + e^{[2-4k2(t-\lambda)]}} \varepsilon$$

Em que:

$V(t)$  = volume acumulado no tempo  $t$ ;

$Vf$  e  $Vf2$  = volume de gás (mL) oriundo da fração de rápida digestão (açúcares solúveis e amido) e lenta (celulose e hemicelulose), respectivamente;

$K$  e  $K2$  = taxa de degradação das frações de digestão rápida e lenta ( $h^{-1}$ ), respectivamente;

$\lambda$  = latência ou tempo de colonização das bactérias (horas).

Os valores de pH dos tratamentos foram imediatamente registrados utilizando um peagâmetro. Para a determinação das concentrações de N-amoniaco ( $N-NH_3$ ) os frascos foram colocados em gelo, com o objetivo de cessar a atividade microbiana. Após o resfriamento foram coletados 10 mL de líquido, que posteriormente foram destilados, segundo a metodologia descrita por Detmann *et al.* (2012).

## 2.7 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial (5x4), sendo o primeiro fator relações de volumoso: concentrado e o segundo fator concentração de geoprópolis, segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + C_j + TC_l + \varepsilon_{ijkl}$$

Em que:  $\mu$  = Média geral;  $T_i$  = Efeito de relação volumoso: concentrado,  $i = 1, \dots, 5$ ;  $C_j$  = Efeito de dose,  $j = 1, \dots, 4$ ;  $TC_k$  = Efeito da interação proporção x dose e  $\varepsilon_{ijkl}$  = Erro experimental associado a cada observação  $Y$ .

Os parâmetros do modelo de cinética de fermentação ruminal foram estimados pelo método de Gauss-Newton inserido no procedimento PROC

NLIN. As estimativas dos parâmetros de cinética de fermentação, pH e N-NH<sub>3</sub> foram submetidas à análise de variância, foi realizada regressão para os níveis de geoprópolis e teste de Tukey para as relações das dietas experimentais, sendo considerada significativa à 5% de probabilidade.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve efeito significativo ( $P>0,05$ ) para os parâmetros de cinética de fermentação ruminal *in vitro* (tabela 6), tanto para as dietas quanto para as concentrações de extrato etanólicos da geoprópolis (EEG).

**Tabela 6:** Médias de volume final de produção de gases oriundos da degradação dos carboidratos fibrosos (VfCF), suas respectivas taxas de degradação (KdCF e KdCN) e *lag time* (L) das dietas com diferentes concentração de extrato etanólico de geoprópolis.

Dietas	VfCF (mL/g de MS)				EPM	P-valor	
	Concentração de EEG (%)					L	Q
	0	15	30	60			
70:30	80,75	76,08	80,53	75,50	4,2175	0,8651	0,9158
60:40	88,02	82,22	83,31	75,29	3,9430	0,1635	0,3588
50:50	91,75	72,14	78,94	72,14	4,1654	0,2873	0,3703
40:60	83,89	84,06	77,23	75,20	4,7257	0,3876	0,6023
30:70	90,53	86,80	86,08	93,50	4,3569	0,9565	0,8643
P-valor	0,8705	0,7399	0,9754	0,5506			
EPM	3,5748	3,6225	4,2238	4,1830			
Dietas	VfCNF (mL/g de MS)				EPM	P-valor	
	Concentração de EEG (%)					L	Q
	0	15	30	60			
70:30	49,94	69,28	65,57	46,10	4,6505	0,6192	0,3580
60:40	63,33	77,69	48,29	63,63	4,7475	0,7781	0,5780
50:50	69,75	69,56	59,54	69,56	4,4932	0,7576	0,8659
40:60	76,68	68,35	80,12	67,55	3,9937	0,8771	0,6000
30:70	68,03	59,98	52,07	64,17	6,7708	0,7707	0,6447
P-valor	0,2464	0,8816	0,3007	0,3549			
EPM	3,8975	4,9520	5,0286	4,0878			
Dietas	KdCF (h <sup>-1</sup> )				EPM	P-valor	
	Concentração de EEG (%)					L	Q
	0	15	30	60			
70:30	0,0231	0,0192	0,0520	0,0223	0,0067	0,8954	0,3187
60:40	0,0218	0,0194	0,0220	0,0203	0,0005	0,3259	0,5114
50:50	0,0224	0,0193	0,0216	0,0193	0,0007	0,4885	0,7846
40:60	0,0366	0,0215	0,0209	0,0211	0,0008	0,2076	0,1752
30:70	0,0224	0,0257	0,0228	0,0216	0,0034	0,2688	0,4152
P-valor	0,3692	0,1226	0,3815	0,4415			
EPM	0,0025	0,0008	0,0056	0,0005			
Dietas	KdCNF (h <sup>-1</sup> )				EPM	P-valor	
	Concentração de EEG (%)					L	Q
	0	15	30	60			
70:30	0,1299	0,1061	0,1066	0,1322	0,0053	0,7184	0,2202
60:40	0,1214	0,1216	0,1325	0,1209	0,0051	0,9094	0,5554
50:50	0,1151	0,1337	0,1307	0,1337	0,0060	0,5296	0,721



40:60	0,1260	0,1284	0,1331	0,1244	0,0068	0,5953	0,5673
30:70	0,1134	0,1309	0,1254	0,1310	0,0059	0,8839	0,5561
P-valor	0,7786	0,5183	0,6273	0,9399			
EPM	0,0045	0,0054	0,0057	0,0052			
<i>Lag time</i> (horas)							
70:30	2,9776	2,7144	2,8550	3,1861	0,1505	0,4785	0,7781
60:40	2,9480	2,9515	2,9942	3,2866	0,1458	0,5037	0,5151
50:50	3,0097	2,6327	2,9590	2,6326	0,1669	0,9790	0,9301
40:60	3,220	3,1786	3,1411	3,3902	0,1652	0,7717	0,4265
30:70	3,4499	3,1418	3,2236	3,4431	0,1664	0,7419	0,8349
P-valor	0,8296	0,6094	0,9491	0,4789			
EPM	0,1460	0,1305	0,1451	0,1565			
<i>Vf</i> (mL/g de MS)							
70:30	130,69	148,71	146,10	121,61	7,0716	0,8336	0,5664
60:40	157,69	165,35	131,60	143,38	6,9349	0,3495	0,4510
50:50	165,83	139,24	138,49	139,24	7,2570	0,3934	0,4900
40:60	177,46	152,41	137,48	142,76	7,1288	0,4640	0,3720
30:70	163,41	146,78	141,48	157,67	7,6443	0,9049	0,7235
P-valor	0,1018	0,7966	0,9682	0,5758			
EPM	5,8411	6,2921	6,3344	6,8917			

VfCF= volume de gás das frações de degradação lenta (celulose e hemicelulose); KdCF= taxa de degradação das frações de digestão lenta; VfCNF= volume de gás das frações de degradação rápida (açúcar solúvel e amido); KdCNF= taxa de degradação das frações de digestibilidade rápida; *Lag time*= tempo de colonização das bactérias; EPM= erro padrão da média; L= efeito linear; Q= efeito quadrático.

O volume de gases das frações de degradação lenta (VfCF) não sofreu influência ( $P>0,05$ ) da adição de EEG, os valores observados variaram de 72,14 a 93,50 mL/g de MS. Esse comportamento pode ser devido a pequena dose de extrato utilizado, o que pode ter impedido a eficiência do extrato de geoprópolis na redução da produção de gases para os carboidratos fibrosos em todas as dietas avaliadas.

A taxa de degradação dos carboidratos fibrosos (KdCF) e dos carboidratos não fibrosos (KdCNF), mostraram-se semelhantes ( $P>0,05$ ) entre os tratamentos avaliados por meio da técnica de produção de gases *in vitro*. Este resultado indica que a inclusão de EEG não afetou a degradação das dietas, bem como a atividade ruminal. Os resultados de KdCF e KdCNF encontrados neste estudo são similares aos encontrados por Heimbach *et al.* (2014) ao avaliarem o efeito de diferentes níveis de inclusão do resíduo da extração de própolis marrom na dieta de ruminantes.

É sabido, que os carboidratos fibrosos apresentam degradação mais lenta do que a dos carboidratos não fibrosos, pois demandam por um maior período

de acesso dos microrganismos ruminais, devido a sua constituição, enquanto que os carboidratos não fibrosos encontram-se prontamente disponíveis para a digestão, por este motivo a taxa de degradação para os carboidratos fibrosos é inferior à taxa de degradação de carboidratos não fibrosos (SILVA *et al.*, 2014). Os resultados para KdCF e KdCNF encontrados neste estudo, apresentaram comportamento esperado, de acordo com a literatura.

O *lag time* ou tempo de colonização pelas bactérias ruminais é um parâmetro que está relacionado com a degradação da fração fibrosa presente no alimento (MERTENS E LOFTEN,1980). Não houve diferença significativa ( $P>0,05$ ) para *lag time* (L) entre os tratamentos, variaram de 2,6326 a 3,4499horas, o que indica que o EEG nos diferentes níveis não foi prejudicial a colonização dos microrganismos na digestibilidade *in vitro*. Apesar de não ter ocorrido influência dos tratamentos, o resultado obtido para *lag time* foi semelhante ao resultado obtido por Heimbach *et al.* (2014), que observaram valor médio de 2,55 horas para o líquido ruminal de bovino.

Apesar das diferentes relações volumoso: concentrado, não foi verificado diferença significativa ( $P>0,05$ ) para o parâmetro *leg time*. De acordo com Azevêdo *et al.* (2003), tempo de colonização é proporcional a concentração de fibra em detergente neutro (FDN), entretanto, neste trabalho não foi evidenciado o mesmo, já que o FDN e FDA das dietas experimentais foram semelhantes.

O volume de gás dos carboidratos não fibrosos (VfCNF) foi semelhante entre os tratamentos. A ausência de efeito observada para os parâmetros dos CNF, indicam que o EEG não foi capaz de alterar o desenvolvimento de microrganismo que utilizam estes carboidratos.

As diferentes relações volumoso:concentrado não influenciaram a cinética de degradação dos carboidratos (CFN) não fibrosos, uma vez que o volume final de gás dos carboidratos não fibrosos (VfCNF) e as taxas de degradação dos carboidratos (KdCNF) entre as dietas experimentais ( $P>0,05$ ), a ausência de efeito para os parâmetros dos CFN presume que foram satisfeitos ou mantidos os fatores que afetam o desenvolvimento de microrganismos que utilizam CNF e a degradabilidade destes no rúmen, tais como a sincronização entre a liberação de energia e nitrogênio (RUSSEL *et al.*, 1992), para todas as dietas.

O aumento da concentração de EEG não influenciou ( $P>0,05$ ) a produção do volume final dos gases (Vf) nas diferentes dietas estudadas. Essa ausência de efeito para o volume final de gases também foi observada por Silva (2011) ao avaliar o efeito da inclusão da própolis marrom na forma bruta (2,9; 5,8; 8,7; 11,6 e 14,5 g/kgMS) e de extrato etanólico (3,98; 7,96; 11,94; 15,93 e 19,91 mL/kgMS), sobre a produção de gás *in vitro*.

Com relação ao VfCF das dietas, não observou-se efeito ( $P>0,05$ ), os valores variaram de 121,61 a 177,66mL/g de MS. De acordo com Nogueira *et al.* (2006) o volume de gás produzido depende da natureza do alimento, mais precisamente de sua composição, pois quanto maior a quantidade de fibra, maior a produção de gases, e quanto maior o teor de amido, menos a produção de gases. Neste trabalho não foi evidenciado o mesmo, uma vez que o FDN, FDA e CNF das dietas experimentais foram semelhantes apesar das diferentes relações volumos:concentrado.

O EEG utilizado no presente estudo não promoveu redução no volume final de gás ao longo das 96 horas de incubação, este fato pode ter relação com os flavonóides presentes em sua composição, uma vez que o estudo realizado por Oskouein *et al.* (2013) comprovou que a capacidade de modulação da atividade da fermentação ruminal depende do tipo de flavonoide utilizado. A dose de EEG ministrada no presente estudo (0,2mL), é outro fator que pode estar relacionado com a ausência de efeito sobre o volume de gás final. Foi utilizado como referência para a dose utilizada o trabalho realizado por Stradiotti Júnior *et al.* (2004b).

Portanto, a geoprópolis utilizada, poderia apresentar maiores efeitos sobre as bactérias presentes no líquido ruminal e conseqüentemente melhores resultados para cinética ruminal *in vitro*. Desta forma, faz-se necessário estudos sobre a composição dos compostos presentes na geoprópolis, uma vez que foi evidenciado por Oskouein *et al.* (2013) que o tipo de pode influenciar a fermentação ruminal.

A inclusão de extrato etanólico de geoprópolis aumentou o pH nas dietas ( $P<0,05$ ) ao ser comparado com os tratamentos controle (tabela 7). Verificou-se que o pH foi influenciado de forma quadrática pelos níveis com concentração de 30 e 60 de EEG, em que estes níveis apresentaram os maiores valores de pH

nas dietas com relação volumoso:concentrada de 70:30 e 50:50 ao serem comparados com o controle. A inclusão de EEG pode ter provocado a inibição de bactérias *Streptococcus bovis* devido à elevação no pH, visto que estas são associadas a produção de lactato e queda no pH ruminal. Os resultados desse estudo são similares aos encontrados por Stradiotti Júnior *et al.* (2004a) que obtiveram aumento do pH nos tratamentos com extrato de própolis (16,7; 33,3; 50,0; 66,7; 83,3; e 100,0%).

**Tabela 7:** Valores médios de pH das dietas com diferentes concentrações de extrato etanólicos de geoprópolis.

Dietas	pH			
	Concentração de EEG (%)			
	0	15	30	60
70:30	6,5Ba	6,76Aa	6,82Aa	6,82Aa
60:40	6,62Aa	6,61Aa	6,63Aab	6,63Aab
50:50	6,54Aa	6,53Aa	6,65Aa	6,63Aab
30:70	6,64Aa	6,63Aa	6,66Aa	6,63Aab
40:60	6,69Aa	6,73Aa	6,62Aba	6,45Bb
P-valor	L	0,3078 <sup>1</sup>	0,3708 <sup>2</sup>	0,0138 <sup>3</sup>
	Q	0,6064	0,0730	0,0001
EPM	0,0488	0,0232	0,0203	0,0316

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). EPM= erro padrão da média. L= efeito linear; Q= efeito quadrático EEG= extrato etanólico da geoprópolis. <sup>3</sup>Y= 0,8191 - 0,00027548X + 0,0005791X<sup>2</sup> (r<sup>2</sup>= 0,81); <sup>4</sup>Y= 0,7434 - 0,00034371X + 0,00010732X<sup>2</sup> (r<sup>2</sup>= 0,74).

Os valores de pH encontrados no presente estudo, ficaram dentro de uma faixa de 6,45 a 6,82 indicando que o EEG apresentou capacidade de alterar as características do líquido ruminal *in vitro*, porém preservando as condições de vida dos microrganismos ruminais.

Morsy *et al.* (2015) ao avaliarem o pH sobre o extrato de própolis de abelhas de diferentes origens, não observaram diferença significativa, o mesmo foi mantido em 6,70. Acredita-se que a diferença entre os estudos esteja relacionada principalmente à dose utilizada, uma vez que a dose do EEG foi superior, sendo a possível causa para a variação de pH.

O aumento do pH pode influenciar diretamente a relação acetato:propionato, uma vez que as bactérias formadoras de acetato são beneficiadas em pH elevado, diferentemente das bactérias formadoras de

propionato, que depende de menores valores de pH para atuarem (STRADIOTTI JÚNIOR *et al.*, 2004a), acarretando em perda da eficiência energética.

Entretanto os tratamentos com dieta 40:60, apresentou comportamento inverso aos demais tratamentos. Esta também foi a dieta com maior média de pH entre o grupo controle. Contrariamente, Zhao *et al.* (1993) observaram redução do pH no fluido ruminal, com o aumento da proporção de concentrado na matéria seca das dietas. De acordo com estes autores, a queda no pH pode estar relacionada à maior quantidade de substratos disponíveis para fermentação no rúmen.

De acordo com Russell e Dombrowski (1980), o crescimento das principais bactérias celulolíticas é prejudicado em pH em torno de 6,0-6,1, sendo totalmente inibido em valores abaixo de 5,9. A variação observada nos valores de pH entre os tratamentos, não comprometem a eficiência de síntese microbiana bem como a digestibilidade ruminal, uma vez que esta variação foi de 6,45 a 6,73.

Quanto ao N-NH<sub>3</sub> dos tratamentos, observou-se influência significativa ( $P < 0,05$ ) tanto da dieta quanto da concentração e EEG (tabela 8). Em que as dietas 50:50 e 40:60 apresentaram redução na concentração de N-NH<sub>3</sub> quando foi utilizada a maior concentração de EEG. Alimentos que contem fenóis em sua composição, como tanino condensado em baixo teor (até 6%), podem ser utilizados como um potencial modulador da fermentação ruminal, uma vez que estes são capazes de promoverem aumento do fluxo de proteína para absorção no intestino (PATRA E SAXENA, 2011). A redução na concentração de N-NH<sub>3</sub> indica que uma maior proporção de proteína verdadeira pode escapar do rúmen, o que proporciona um aumento na digestão total do N e na proporção de N retido (SALLAM *et al.*, 2010).

Nas dietas 70:30, 60:40 e 30:70 a concentração de N-NH<sub>3</sub> aumentou ( $P < 0,05$ ) com a concentração de EEG quando comparadas com a o controle. Este efeito pode estar relacionado a ação do EEG sobre as bactérias proteolíticas e hiper-produtoras de amônia.

A menor concentração de N-NH<sub>3</sub> foi de 5,13 mg/dL, esse valor é semelhante a concentração mínima necessária (5 mg/dL) para que ocorra síntese de proteína microbiana no rúmen e atividade microbiana (SATTER E

SLYTE, 1974). Indicando que o EEG não interfere o crescimento microbiano bem como a síntese de proteína.

Ozturk *et al.* (2010) avaliaram o efeito de diferentes concentrações de extrato de própolis sobre a fermentação microbiana ruminal *in vitro*, verificaram efeito positivo na redução de N-NH<sub>3</sub> para as concentrações de extrato de própolis usadas. Acredita-se que os resultados obtidos no presente estudo diferem dos descritos na literatura, devido ao uso da dose e EEG inferior e principalmente que a dose foi adicionada uma única vez às dietas durante todo o tempo de incubação, sendo talvez necessária mais de uma adição da dose testada, para apresentar resultados similares.

**Tabela 8:** Valores médios de N-NH<sub>3</sub> das dietas com diferentes concentrações de extrato etanólicos de geoprópolis.

Dietas	N-NH <sub>3</sub>				
	Concentração de EEG (%)				
	0	15	30	60	
70:30	4,2Cd	10,46Bb	16,01Ab	13,9Ab	
60:40	11,28Ac	10,9Ab	11,01Ac	12,89Ab	
50:50	14,66Ab	15,89Aa	13,66Abc	5,13Bc	
40:60	19,74Aa	16,13Ba	16,09Bb	15,53Bb	
30:70	10,64Cc	17,32Ba	20,83Aa	21,83Aa	
P-valor	L	0001 <sup>1</sup>	0,2059 <sup>2</sup>	0,0753 <sup>3</sup>	0,0794 <sup>4</sup>
	Q	0001	0,0101	0,0030	0,0006
EPM	18,677	10,038	0,6194	13,802	

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem entre si pelo teste de Tukey (P<0,05). EPM= erro padrão da média. L= efeito linear; Q= efeito quadrático. EEG= extrato etanólico da geoprópolis. <sup>1</sup>Y = 0,1052 - 0,0001225X + 0,00058041X<sup>2</sup> (r<sup>2</sup> = 0,10); <sup>2</sup>Y=0,5348 + 0,01397X + 0,00458X<sup>2</sup> (r<sup>2</sup> = 0,53); <sup>3</sup>Y= 0,6193 - 0,00976X + 0,00256X<sup>2</sup> (r<sup>2</sup> = 0,44); <sup>4</sup>Y= 0,7066 - 0,02396 + 0,00501X<sup>2</sup> (r<sup>2</sup> = 0,67).

Segundo Russel *et al.* (2002) altas concentrações de N-NH<sub>3</sub>, indicam um maior nível de degradação da proteína, conseqüentemente ocorre maiores perdas de nitrogênio na forma de amônia, gerando um maior custo de energia pela produção de ureia no fígado. O aumento da concentração de N-NH<sub>3</sub> promovido pela adição de EEG estão dentro do esperado para favorecer a síntese microbiana sem que ocorra prejuízos durante o processo de fermentação ruminal, sendo considerado tóxico quando este atinge valores de concentração superiores de 100mg/100mL (FRANCO *et al.*, 2002).

## 4 CONCLUSÃO

A geoprópolis provocou aumento nos parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*, pH e N-NH<sub>3</sub>, sem que ocorressem efeitos prejudiciais aos processos de fermentação e a microbiota ruminal. As concentração de extrato etanólico de geoprópolis utilizadas não se mostram eficientes, o que sugere novos estudos para a determinação de concentrações eficientes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUERO, M.B.; GONZALESZ, M.; LIMA, B.; SVETAZ, L.; SANCHEZ, M.; ZACCHINO, S.; FERESIN, G.E.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PALERMO, J.; WUNDERLIN, D.; TAPIA, A. 2010. Argentinean própolis from *Zuccagnia punctata* Cav. (Caesalpinaeae) exudates: phytochemical characterization and antifungal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58: 194-201.
- ALVES, R.M.O.; SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L. 2007. Notas sobre a bionomia de *Melipona mandacaia* (Apidae: melípona). *Magistra* 19: 204-202. Antimicrobial feed additives. **Applied Environmental Microbial** 53: 1620-1625.
- AOAC. 2000. Association Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th. Gaithersburg, MD. USA.
- AZEVEDO, J.A.G.; PEREIRA, J.C.; QUEIROZ, A.C.; CARNEIRO, P.C.S.; LANA, R.P.; BARBOSA, M.H.P.; FERNANDES, A.M.; RENNÓ, F.P. 2003. Composição químico-bromatológica, fracionamento de carboidratos e cinética da degradação *in vitro* da fibra de três variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). **Revista Brasileira de Zootecnia** 32: 1443-1453.
- BALCELLS, J.; ARIS, A.; SERRANO, A.; SERADJ, A.R.; CRESPO, J.; DEVANT, M. 2012. Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. **Journal of Animal Science** 90:4975-4984.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; MARCUCCI, C.; POPOV, S. 1998. Constituents of Brazilian geoprópolis. **Z. Naturforsch** 53:402-406.
- BANKOVA, V. 2005. Chemical diversity of própolis and the problem standardization. **Journal of Ethnopharmacology** 100: 114-117.
- BARTH, O.M. 2006. Palynological analysis of geoprópolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of the Universidade de Ribeirão Preto. **Apiacta** 41:71-85.
- BARTH, O.M.; FEITAS, A.S. 2015. Análise palinológica de geoprópolis do Brasil, da Bolívia e Venezuela: uma revisão. **Magistra** 27: 263-268.
- BEAUCHEMIN, K.A.; KREUZER, M.; O'MARA, F.; McALLISTER, T. A. 2008. Nutritional management for enteric methane abatement. **Journal of Experimental Agriculture** 48: 21-27.
- BERCHIELLI, T.T.; MESSANA, J.D.; CANESINI, R.C. 2012. Produção de metano entérico em pastagens tropicais. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal** 13: 954-968.
- CARDOZO, D.V.; MOKOCHINSKI, J.B.; SCHINEIDER, C.M.; SAWAYA, A.C.H.F.; CAETANO, I. K.; FELSNER, M.L.; TORRES, Y.R. 2015. Variabilidade química de geoprópolis produzida pelas abelhas sem ferrão, mandaçaia e mandurí. **Revista Virtual Química** 7:2457-2474.
- CARVALHO, C.A.L.; SOUZA, B.A.; SODRÉ, G.S.; MAECHINE, L.C.; ALVES, R. M. O. 2005. Mel de abelhas sem ferrão: contribuição para a caracterização físico-química. **Série meliponicultura** 4: 32.
- COSTA JÚNIOR, G.B.J.; ZEOULA, L. M.; FRANCO, S. L.; MOURA, L.P.P.; VALERO, M. V.; SIMIONI, F. L.; PAILA, E. M.; SAMENSARI, R. B.; 2012 Effect of própolis product on digestibility na ruminal parameters in buffalos consuming a forage-based diet. **Italian Journal of Animal Science**. 11: 443-448.
- COTTLE, D.J.; NOLAN, J.V.; WIEDEMANN, S.G. 2011. Ruminant enteric methane mitigation. **Animal Production Science** 51: 491-514.
- CUNHA, M.S.; DUARTE, R.P.; BATISTA, M.C.A.; ABREU, B.V.B.; SANTOS, J.R.; NEIVA, V.A.; AMARAL, F.M.M.; RIBEIRO, M.N.S. 2009. Padronização de extrativos de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tíuba). **Cadernos de Pesquisa** 16:31-38.



- DETMANN, E.; CECON, P.R.; PAULINO, M.P.; VALADARES FILHO, S.C.; HENRIQUES, L.T.; DETMANN, K.S.C. 2007. Rumen variables evaluated through continuum mathematical functions. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42: 1651-165.
- DETMANN, E.; SOUZA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M; AZEVEDO, J.A.G. 2012. **Métodos para análise de alimentos**. Suprema Visconde do Rio Branco, Minas Gerais, Brasil.
- DUALIBE, S.A.C; GONÇALVES, A.G.; AHID, F.J.M. 2007. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* in vivo. *Journal of Applied Oral Science* 15: 420-423.
- DUARTE, R.P.; NOGUEIRA, A.M.C.; MARQUES, R.R.O.; COSTA, M.C.P., RIBEIRO, M.N.S. 2008. Avaliação farmacológica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (túba) em município da Baixada maranhense. Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 28: 557-562.
- ECKARD, R.J.; GRAINGER, C.; DE KLEIN, C.A.M. 2010. Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: **Livestock Science** 130: 47–56.
- FERNANDES JÚNIOR, A.; LOPES, M.M.R.; COLOMBARI, V.; MONTEIRO, A. C. M.; VIEIRA, E. P. 2006. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**. 36: 294-297.
- FERNANDES, JR. A.; LEOMIL, L.; FERNANDES, A.A.H.; SFORCIN, J.M. 2001. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. **Journal of Venomous Animals Toxins** 7: 173-182.
- FONTANA, J.D.; ADELMANN, J.; PASSOS, M.; MARASCHIN, M.; LACERDA, C.A.; LANÇAS, F.M. 2004. **Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity**. p. 203-218. In: SPENCER, J. F. T.; SPENCER, A.L.R., eds. *Environmental microbiology: methods and protocols*. Totowa: Humana Press.
- FOTITUS, A.C.A.; FERREIRA, M. A.; VÉRIAS, A.S.C.; SALLA, L. E.; SOUZA, A. R. D. L.; 2014. Estratégia de nutrientes para ovinos em distintas sequências de fornecimento alimentar em dietas a base de palma forrageira. **Revista Brasileira Saúde e Produção Animal** 15: 504-516.
- FRANCO, G.L.; ANDRADE, P.; BRUNO FILHO, J.R.; DIOGO, J.M.S. 2002. Parâmetros ruminantes e desaparecimento da FDN da forragem em bovinos suplementados em pastagem na estação das águas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 31: 2340-2349
- FRANZOLIN, R.; DEHORITY, B. A. 2010. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 2262-2267.
- FREITAS, J.A.; ANTONAGELO, R.P.; RIBEIRO, J.L.; JOSLIN, M.; NOGUEIRA, S.R.P.; SOUZA, J.C. 2009. Extrato etanólico de própolis na alimentação de vacas em lactação. **Revista Brasileira de Produção Animal**. 10: 333-343.
- FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. 2006. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 26: 171-178.
- FURLAN, R.L.; MASCARI, M.; FILHO, D. F. 2011. **Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal**. p. 1-21. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G., eds. *Nutrição de ruminantes*. 2ed. Funep. Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- GOES, R.H.T.B.; MANCIO, A.B.; LANA, R.P.; CECON, P.R.; ALVES, D. D.; FREITAS, T.B.; BRABES, K.C.S. 2010. Suplementação protéica e energética para novilhos em recria, durante o período da seca. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal** 11: 1081-1094.
- GUAN, H.; WITTENBERG, K.M.; OMINSKI, K.H.; KRAUSE, D.O. 2006. Efficacy of ionophores in cattle diets for mitigation of enteric methane. **Journal of Animal Science** 84: 1896-1906.
- HALL, M.B. 2000. **Neutral detergent-soluble carbohydrates. Nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida.
- HAMMOND, K.L.; MUETZEL, S.; WAGHORN, G.C.; PINARES-PATINO, C.S.; BURKE, J.L.; HOSKIN, S.O. 2008. The variation in methane emissions from sheep and cattle is not explained by the chemical composition of ryegrass. **Society of Animal Production** 69: 174-178.

- HAVSTEEN, B. H. 2002. The Biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics** 96:67-202.
- HEGARTY, R.S. 1999. Mechanisms for competitively reducing ruminal methanogenesis. *Australian Journal Agricultural Research*. 50:1299-1305, 1999.
- HEIMBACH, N.S.; ÍTAVO, C.C.B.F.; ÍTAVO, L.C.V.; FRANCO, G.L.; SILVA, P. C. G.; REZENDE, L. C.; SILVA, J. A. 2014. Resíduo da extração de própolis marrom na dieta de ruminantes: digestibilidade e produção de gás *in vitro*. **Archivos de Zootecnia**. 63: 259-267.
- HOMEM JÚNIOR, A.C.; EZEQUIEL, J. M.B.; FÁVARO, V.R.; OLIVEIRA, P.S.N.; D'AUREA, A. P.; SANTOS, V. C.; GONÇALVES, J. S. 2010. Fermentação ruminal de ovinos alimentados com alto concentrado e grãos de girassol ou gordura protegida. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia** 62: 144-153.
- JOHNSON, K.A.; JOHNSON, D.E. 1995. Methane emissions from cattle. **Journal of Animal Science** 73: 2483-2492.
- KIM, E. T.; GUAN, L.L.; LEE, S.J.; LEE, S.M.; LEE, S.S; LEE I.D.; LEE, S.K; LEE S.S. 2015. Effects of flavonoid –rich plant extracts on *in vitro* ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. **Animal Feed Science** 4: 530-537.
- KOZLOSKI, G.V. 2011. **Bioquímica dos Ruminantes**. Santa Maria: Ed. da UFSM. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
- KUMAR, S.; PUNIYA, A.K.; PUNIYA, M.; DAGAR, S.S.; SIROHI, S.K.; SINGH, K.; GRIFFITH, G.W. 2009. Factors affecting rumen methanogens and methane mitigation strategies. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 25: 1557-1566.
- LIBERIO, S.A.; PEREIRA, A.L.A.; DUTRA, R.P.; REIS, A.S.; ARAÚJO, M.J.A.M.; MATTAR, N.S.; SILVA, L.A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; GUERRA, R.N.M.; MONTEIRO-NETO. 2011. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geoprópolis produced by the stingless bee *Meliponafasciculata* Smith. **Complement. Alternat. Med.** 11: 10-13.
- LOPEZ, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; NAGEM T.J.; PINTO, A.S. 2000. Flavonóides: farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biociência** 3:18-22.
- MAKKAR, H.P.S. 2005. *In vitro* gas methods for evaluation of feeds containing phytochemicals. 2005. **Animal Feed Science Technology**. 123:291-302.
- MANELLA, M.Q.; LOURENÇO, A.J.; LEME, P.R. 2003. Recria de bovinos Nelore em pastos de *Brachiaria brizantha* com suplementação proteica ou com acesso a banco de proteína de *Leucaena leucocephala*. Característica de fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia** 32:1002-1012.
- MARQUES, K.M.S.; ROCHA JÚNIOR, V.R.; REIS, S. T.; SOUZA, V.M.; PIRES, D.A.A.; PALMA, M.N.N.; SILVA, G.W.V.S.; ANTUNES, A. P. S. 2013. Cinética de fermentação *in vitro* de silage da parte aérea de mandioca. **Revista Brasileira de Produção Animal** 14: 233-247.
- MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M. K. 1999. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science Technology** 79: 321-330.
- MAURÍCIO, R.M.; PERREIRA, L.G.R.; RODRIGUEZ, N.M. 2003. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**. 55: 1013-1020.
- McCALLISTER, T.A.; NEWBOLD, C.J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. **Australian Journal of Experimental Agriculture** 48:7-13.
- McDOUGALL. 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. **Biochem Journal**. 43: 99-109.
- MERTENS, D.R.; LOFTEN, J.R. 1980. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics *in vitro*. **Journal of Dairy Science** 63: 1437-1446.

- MIRZOEVA, O.K.; GRISHANIN, R.N.; CALDER, P.C. 1997. Antimicrobial action of própolis and some of its componentes: the effects on growth, membrane potencial and motility of bactéria. **Microbiology Research**. 152: 239-246
- MORAIS, J.A.S.; BERCHIELLI, T.T.; REIS, R.A. 2011. **Aditivos**. p.539-570. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G., eds. Nutrição de ruminantes. 2ed. Funep.Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
- MORSY, A.S; SAHAN, Y.A; SALLAM, S.M.A; KREUZER, M.; ALENCAR, S.M.; ABDDALLA, A.L. 2015. Comparion of the in vitro efficiency of supplementary bee própolis extracts of diferente origin in enhancing the ruminal degradability of organic malter and mitigation the formation of methane. **Animal Feed Science and Technology** 199: 51-60.
- NAGAJARA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; VAN NEVEL, C.J.; DEMEYER, D. I. 1997. **Manipulation of ruminal fermentation**. p. 1-6. In: HOBSON, P.N. and STEWART, C.S. The rumen microbial ecosystem. Blackio Academic & professiol, London.
- NAGAJARA, T.G.; TAYLOR, M.B. 1987. Susceptibility and resistance of ruminal bacterial to antimicrobial feed additives. **Appl Environ Microbiol**. 53: 1620–1625
- NAGARAJA, T. G. 2003. Response of the Gut and Microbial Populations to Feedstuffs: The ruminant story. Minnesota Nutrition Conference 64: 64-77.
- NOGUEIRA, U.T.; MAURÍCIO, R.M.; GONÇALVES, L.C. 2006. Comparação de substratos com diferentes quantidades de carboidratos solúveis utilizando a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia** 58:901-909.
- NOGUEIRA-NETO, P. 1997. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Ed. Nogueirapis. São Paulo.
- NUSSIO, L.G.; CAMPOS, F.P.; LIMA, M. L. M. 2011. **Metabolismo de carboidratos estruturais**. p.193-234. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S.G., eds. Nutrição de Ruminantes. 2ed. Funesp, Jaboticabal, São Paulo, Brasil=
- OLIVEIRA, J.S.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; MANTOVANI, H. C.; GENEROSO, R. A. R. 2006. Efeito da monensina e da própolis sobre a atividade de fermentação de aminoácidos *in vitro* pelos microrganismos ruminais. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 35: 275-281.
- ØRSKOV, E.R.; TYLE, M. 1990. Energy nutrition in ruminants. Cambridge: **Elsevier Science Publishers**. 146.
- OSKOUÉIAN, E.; ABDULLAH, N.; OSKOUÉIAN, A. 2013. Effects of flavonoides on rumen fermentation activity, methaane production, and microbial population. **BioMed Research International**. 1-8.
- OZTURK, H; PEEKCAN, M.; SIRELI, M.; FIDANCI, U.R. 2010. Effects of própolis on in vitro rumen microbial fermentation. **Ankara universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi** 57: 2017-221.
- PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. 2007. Método para avaliação e pesquisa antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacologia**. 17: 102-107.
- PARK, Y.K; PAREDES-GUZMAN, J.F; AGUIAR, C.L; ALENCAR, S.M; FUJIWARA, F.Y. 2007. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52: 1100–1103.
- PATRA, A.K., SAXENA, J. 2011. Exploration of dietary tannins to improve rumen metabolism and ruminant nutrition. **Journal. Science Food Agriculture** 91: 24–37.
- PEDREIRA, M.S.; OLIVEIRA, S.G.; BERCHIELLI, T.T.; PRIMAVERIS, O. 2005. Aspectos relacionados com a emissão de metano de origem ruminal em sistemas de produção de bovinos. **Archives of Veterinary Science**. 10: 24-32.
- PEIXOTO, J. P.N.; RODRIGUES, A.E.; GOIS, G.C. 2010. Efeito da própolis de abelhas africanizadas em microrganismos do líquido ruminal. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. 5:86-90.
- PINTO, M.S. FARIA, J.E.; MESSAGE, D.; CASSINI, S.T.A.; PEREIRA, C.S.; GIOSO, M.M. 2001. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de

vacas com mastite. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 38:278-283.

PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; MOURA, L.P.P.; FRANCO, S.L.; PRADO, I.N.; GOMES, H.C. C. 2010. Digestibilidade e parâmetros ruminais de dietas à base de forragem com adição de própolis e monensina sódica para bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia** 39: 1336-1345.

PRADO, O.P.P.; ZEOULO, L.M., PONTARA, L.P.M.; FRANCO, S.L.; NOVELLO, C.R.; GERON, L.J.V. 2010b. Adição de própolis ou monensina sódica sobre digestibilidade *in vitro* da matéria seca. **Revista Brasileira Saúde Produção Animal**. 11: 1023-1032.

RISPOLI, T.B.; RODRIGUES, I.L.; MARTINS NETO, R.G.; KAZAMA, R.; PRADO, O.P.P.; ZEOULA, L.M.; ARCURI, P.B. 2009. Protozoários ciliados do rúmen de bovinos e bubalinos alimentados com dietas suplementadas com monensina ou própolis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 44: .92-97.

RUSSEL, J.B.; DOMBROWSKI, D.B. 1980. Effect of pH on the efficiency of growth by pure cultures of rumen bacteria in continuous culture. **Applied and Environmental Microbiology**. 39: 604-610.

RUSSEL, J.B.; MANTOVANI, H.C. 2002. The bacteriocins of ruminal bacteria and their potential as an alternative to antibiotics. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology** 4: 347-355.

RUSSELL, J.B.; O'CONNOR, J.D.; FOX, D.G.; Van SOEST, P.J.; SNIFFEN, C.J. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets – I: ruminal fermentation. **Journal of Animal Science** 70: 551-356.

SILVEIRA, M.F.; KOZLOSKI, G.V.; BRONDANI, I.L.; ALVES FILHO, D.C.; LEITE, D.T.; METZ, P.A.; SILVEIRA, S.R.L. 2006. Ganho de peso vivo e fermentação ruminal em novilhos mantidos em pastagem cultivada de clima temperado e recebendo diferentes suplementos. **Ciência Rural**. 36: 898-903.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*. 299: 152-177.

SOUZA, B.A.; CARVALHO, C.A.L.; ALVEZ, R.M.O.; DIAS, C.S.; CLARTON, L. 2009 **Mundurí (Melipona Asilvai): a abelha sestrosa**. Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, Bahia.

SOUZA, D.M.N.; OLIVEIRA, R.G.; MARTINS, C.G.; ABRANTES, M.R.; COELHO, W.A.C.; SILVA, J. B. Al.; MORAIS, S. M.; BATISTA, J. S. 2015. Prospecção fitoquímica, toxicidade *in vitro* e avaliação das atividades anti-radicalar e antibacteriana da geoprópolis da abelha jandaíra. **Acta veterinária Brasilica** 9: 134-140.

STRADIOTTI JÚNIOR, D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; CAMARDELLI, M.M.L.; DETMANN, E.; EIFERT, E.C.; NUNES, P.M.M.; OLIVEIRA, M.V.M. 2004b. Ação do extrato de própolis sobre a fermentação *in vitro* de diferentes alimentos pela técnica de produção de gás. **Revista Brasileira de Zootecnia**. 33: 1093-1099.

STRADIOTTI JÚNIOR. D.; QUEIROZ, A.C.; LANA, R.P.; PACHECO, C.G.; EIFERT, E.C.; NUNES, P.M.M. 2004a. Ação da própolis sobre a desaminação de aminoácidos e a fermentação ruminal. **Revista Brasileira de Zootecnia**.33: 1086-1092.

THEODOROU, M.K., WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN A.B.; FRANCE, J. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. **Animal Feed Science and Technology** 48:185-197.

TOMAS-BARBERRAN, F. A.; GARCIA-VIGUERA, C.; VIT-OLIVIER, P.; FERRERES, F.; TOMAS-LORENTE, F. 1993. Phytochemical evidence for the botanical origin of tropical for Venezuela. **Phytochemistry** 34: 191-196.

VALADARES FILHO, S.C.; COSTA E SILVA, L.F.; LOPES, S.A.; PRADO, L.F.; CHIZZOTTI, M.L.; MACHADO, P.A.; BISSARO, L.Z.; FURTADO, T. 2016. **BR-CORTE 3.0**. Cálculo de exigências nutricionais, formulação de dietas e predição de desempenho de zebuínos puros e cruzados. Disponível em [www.brcorte.com.br](http://www.brcorte.com.br). Acesso em 15 de março de 2017.

VAN SOEST, P.J. 1994. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 476.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Dairy Science**. 74:3583-3597.

VELIKOVA, M.; BRANKOVA, V.; MARCUCCI, M. C.; TSVETKOVA, I.; KUJUMGIEV, A. 2000. Chemical composition and biological activity of propolis from Brazilian meliponinae. **Zeitschrift für Naturforsche** 55: 785-789.

VILLAS-BÔAS, J. 2012. Manual tecnológico: Mel de abelhas sem ferrão. **Instituto Sociedade, População e Natureza** (ISPN). Brasília, DF, Brasil.

ZHAO, J.Y.; SHIMOJO, M.; GOTO, I. 1993. The effects of feeding level and roughage/concentrate ratio on the measurement of protein degradability of two tropical forages in rumen of goats, using the nylon bag technique. **Animal Feed Science na Technology** 41: 261-269.