

### Efeito do uso de própolis sobre a presença de bactérias no líquido ruminal de bovino

Eliane Gasparino<sup>1</sup>, Ana Paula Del Vesco<sup>1</sup>, Stefania Caroline Claudino da Silva<sup>1</sup>, Adriana Bagatoli<sup>1</sup>, Valério Américo Balani<sup>2</sup>, Lucia Maria Zeoula<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – UEM

<sup>2</sup>Laboratório São Camilo- Biotecnologia.

**Resumo:** Os animais ruminantes apresentam atividade de microrganismos no rúmem e intestino. Pode-se manipular o padrão de fermentação ruminal, através do uso de alguns produtos. A própolis é capaz de inibir bactérias gram-positivas e tem sido investigada a fim de substituir o uso dos ionoforos convencionais. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do uso da monensina e da própolis sobre a presença de bactérias no líquido ruminal de bovinos. O experimento foi conduzido utilizando bovinos da raça Holandesa, distribuídos em delineamento quadrado latino 5x5 recebendo uma dieta base suplementada com cinco tratamentos distintos: controle, monensina sódica, LLOS B3+, LLOS C1+ e LLOS C1++. Foi coletado líquido ruminal de bovinos para a extração e amplificação do gene 16S rRNA das bactérias. Através da amplificação foi observada a ocorrência de bactérias das espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium* e *Anaerovibrio lipolytica*. O tratamento controle foi positivo para 20,55% das amostras, monensina sódica mostrou-se positivo para 16,44% e os tratamentos que continha produtos a base de própolis LLOS B3+, LLOS C1+ e LLOS C1++, foram positivos para 20,55%, 26,02%, 16, 44% das amostras respectivamente. Pode-se concluir que os produtos utilizados como aditivos neste experimento pode influenciar na característica da flora ruminal, alterando a composição de suas bactérias.

**Palavras-chave:** amplificação, flavonóides, gene

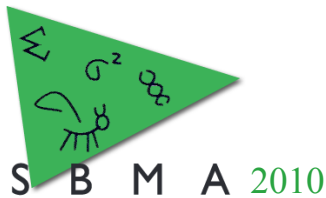
### Effect of propolis on the presence of bacteria in bovine rumen fluid

**Abstract:** Ruminant animals have the activity of microorganisms in the rumen and intestine. You can manipulate the pattern of rumen fermentation through the use of some products. Propolis is able to inhibit Gram-positive bacteria and has been investigated in order to replace the use of conventional ionophores. The aim of this study was to evaluate the effect of use of monensin and propolis on the presence of bacteria in rumen fluid of cattle. The experiment was conducted using Holstein cows, allotted in a 5x5 Latin square receiving, a basal diet supplemented with five different treatments: control, monensin, LLOS B3 +, LLOS C1+ and LLOS C1 + +. Was collected from bovine rumen fluid for the extraction and amplification of the 16S rRNA of bacteria. By amplification was observed the occurrence of bacterial species *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, and *Eubacterium ruminantium* *Anaerovibrio lipolytica*. The control group was positive for 20.55% of the samples, monensin was positive for 16.44% and the treatments containing products based on propolis LLOS B3 +, LLOS C1+, LLOS C1 + + were positive for 20.55%, 26.02%, 16, 44% of samples respectively. It can be concluded that the products used as additives in this experiment can influence the characteristic of the ruminal flora, altering the composition of their bacterial.

**Keywords:** amplification, flavonoids, gene

### Introdução

Os animais ruminantes são caracterizados por apresentarem atividade de microrganismos no rúmem e intestino. O processo de fermentação ruminal é responsável pela transformação dos componentes da dieta em produtos úteis, não - úteis ou até mesmo tóxicos para o animal hospedeiro (Van Soest, 1994). Pode se conseguir manipular o padrão de fermentação ruminal, para manter a saúde do animal ou alcançar maiores níveis na produção, através do uso de alguns produtos. É possível manipular o tamanho e a atividade predominante das bactérias ruminais nativas oferecendo vantagem seletiva às



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

bactérias de interesse (Weimer, 1998). As principais metas a serem alcançadas são entre outras aumentar a produção de ácido propiônico e diminuir a produção de metano. A produção indesejável de gás metano pelas bactérias ruminais e intestinais pode corresponder a uma perda energética de 2 a 12% em relação à energia do alimento ingerido (Embrapa, 2010). Bactérias gram-positivas são responsáveis por alguns dos processos de fermentação ruminal considerados ineficientes ou mesmo prejudiciais. Aditivos ionóforos atuam inibindo bactérias gram-positivas através da catalisação das trocas de sódio e prótons ou prótons e potássio na membrana mudando a direção dos íons e facilitando seus movimentos, funcionando como carreadores móveis dentro da membrana e movimentando milhares de íons por segundo (Pressman, 1976). Em virtude da tendência do mercado consumidor em optar cada vez mais por produtos de origem natural, e sem a intervenção de medicamentos como os aditivos ionóforos, se faz necessário a busca por produtos alternativos que possam substituí-los. A própolis é uma substância resinosa e balsâmica, que possui coloração e consistência diversa, sua composição química depende da ecologia botânica de cada região e ainda pode sofrer influência da variedade genética das rainhas. Até o momento, já foram identificados muitos de seus compostos químicos, dentre os quais flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides, aldeídos, álcoois, ácidos alifáticos e ésteres, aminoácidos, esteróides e açúcares (Confederação Brasileira de Apicultura, 2010). A própolis é capaz de inibir bactérias gram-positivas e, portanto tem sido investigada a fim de poder substituir o uso dos ionoforos convencionais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do uso da monensina e da própolis sobre a presença de bactérias no líquido ruminal de bovinos.

### **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido utilizando bovinos da raça Holandesa fistulados no rúmen, distribuídos em delineamento quadrado latino 5x5. Os animais receberam uma dieta base contendo 47% de volumoso (silagem de milho) e 53% de concentrado à base de milho moído, farelo de soja e sal mineral. A dieta possuiu 12,7% de PB, 74% de NDT, 30% de FDN e 16% de FDA. À ração foi adicionado monensina sódica ou produto a base de própolis que diferiam entre si quanto à concentração de flavonóides totais, distribuídos em cinco tratamentos distintos: LLOS B3+, LLOS C1+ e LLOS C1++ (0,022 mg/g 0,036 mg/g; e 0,054 mg/g de flavonóides totais medidos em crisina, em HPLC), tratamento controle e monensina sódica. Os produtos a base de própolis LLOS diferem na concentração de própolis (B < C), na diluição alcoólica (1 < 3) e na dosagem (+ < ++). O fubá de milho foi usado como produto excipiente, de forma que as doses diárias ficassem em 10 g de produto final. A monensina foi fornecida na quantidade indicada pelo fabricante. O período de adaptação às dietas experimentais foi de 15 dias. Após esse período foi realizada a coleta manual do conteúdo ruminal no período da manhã, antes da alimentação matinal, e retirado uma alíquota de 14mL do material ainda fresco. O material foi analisado através da amplificação do gene 16S rRNA das bactérias *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium* e *Anaerovibrio lipolytica*, e verificado em gel de agarose corado com brometo de etideo, a presença ou ausência das mesmas nos diferentes tratamentos. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Statistical Analysis System (2000). Os resultados foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis ( $p = 0,05$ ).

### **Resultados e Discussão**

Através da amplificação do gene 16S rRNA, pode ser observada a ocorrência de bactérias das espécies *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium* e *Anaerovibrio lipolytica* (Figura 1)

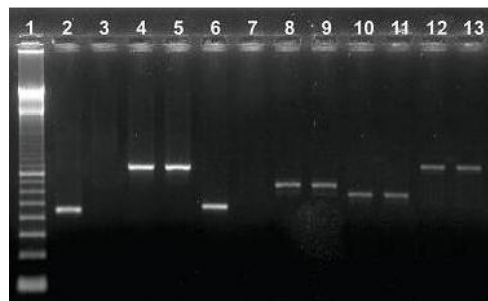


Figura 1 Visualização em gel de agarose: Canaleta 1 – Padrão (10pb). Canaletas 2, 4, 6, 8, 10 e 12 tratamento monensina sódica e primers de *Fibrobacter succinogenes*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium*, *Anaerovibrio lipolytica* e *Ruminococcus flavefaciens* respectivamente. Canaletas 3, 5, 7, 9, 11 e 13 tratamento LLOS C1++ e primers de *Fibrobacter succinogenes*, *Streptococcus bovis*, *Prevotella ruminicola*, *Eubacterium ruminantium*, *Anaerovibrio lipolytica* e *Ruminococcus flavefaciens* respectivamente.

Com base no total de amostras com resultado positivo (Tabela 1), foi possível observar que o tratamento controle foi positivo para 20,55% das amostras, o tratamento ao qual foi adicionado monensina sódica mostrou-se positivo para 16,44% e os tratamentos que continha produtos a base de própolis LLOS B3+, LLOS C1+ e LLOS C1++, foram positivos para 20,55%, 26,02%, 16, 44% das amostras respectivamente.

Tabela 1 Número total de amostras com resultado positivo para bactérias.

Tratamento	F. succinogenes	R. flavefaciens	S. bovis	P. ruminicola	E. ruminantium	A. lipolytica
Controle	3	3	2	2	3	2
Monensina sódica	3	1	3	1	3	1
LLOS B3+	2	2	3	2	3	3
LLOS C1+	4	3	3	2	3	4
LLOS C1++	4	3	3	0	1	1

Em relação a bactérias gram-positivas, foi observada a presença de 39 amostras com resultado positivo. O tratamento controle foi positivo para 20,51% do total das amostras, o tratamento adicionado com monensina sódica 17,95%, uma redução de 2,56% em relação ao controle. O tratamento com produto a base de própolis LLOS B3+, mostrou igual quantidade de amostras positivas para as bactérias gram-positivas que o tratamento controle, o tratamento LLOS C1+ apresentou amplificação para 23,07% das amostras e o tratamento LLOS C1++ se mostrou igual ao tratamento com a adição da monensina sódica, sendo positivo para 17,95% das amostras. Diversos estudos tem sido conduzidos no sentido de obter resultados favoráveis da própolis atuando com substancia ionófora. Keskin et al 2001, verificaram que extratos de própolis apresentaram atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *Streptococcus*), mas teve fraca atividade contra bactérias gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

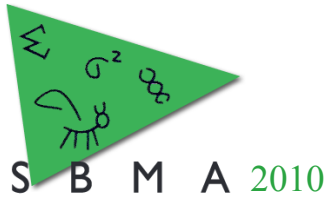
No presente estudo não houve diferença estatística significativa.

### Conclusões

Os produtos utilizados como aditivos neste experimento pode influenciar na característica da flora ruminal, alterando a composição de suas bactérias.

### Literatura citada

Embrapa gado de corte. Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte. Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc106/04ionoforos.html>> Acesso em: 12/02/2010.



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

KESKIN, N.; HAZIR, S.; BASER, K.H.C. et al. Antibacterial Activity and Chemical Composition of Turkish Propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, vol.56, p.1112-1115, 2001.

LENGLER, S. Própolis. Disponível em: < <http://www.brasilapicola.com.br/node/105>> Acesso em: 15/04/2010.

PRESSMAN, B.C. Biological applications of ionophores. **Annual Review of Biochemistry**, vol.45, p.501-530, 1976.

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

WEIMER, P. Manipulating Ruminant Fermentation: A Microbial Ecological Perspective. **Journal of Animal Science**, vol.76, p.3114-3122, 1998.